

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE QUÍMICA BIOLÓGICA,
MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA “MARCO ANTONIO
GARRIDO MALO”



**DETERMINACIÓN DEL RECuento MICROBIANO DE
PRODUCTOS DERIVADOS DE LA MACA (*Lepidium meyenii*
W.) UTILIZANDO PLACAS PETRIFILM Y SU COMPARACIÓN
CON EL MÉTODO CONVENCIONAL**

TESIS
para obtener el Título Profesional de Químico Farmaceutica

AUTORES
Rios Ccolque, Karen Roxana
Riquez Alvaro, Ivonne Katty

ASESORA
Salazar Salvatierra, María Elena

Lima – Perú
2007

DEDICATORIAS

A Dios por ser la luz que ilumina mi v
por bendecirme con esta profesión y por
su inmenso amor.

A mis padres Andres y Silvia por su amor,
comprensión y apoyo incondicional en cada
momento de mi vida.

A mi hermano Daniel por ser mi guía
y ejemplo, gracias por tu apoyo y
consejos acertados.

A mis hermanos Andres, Cesar, Janet,
Giovanna, Karina y Diana por su cariño
y amor, cada uno es importante en mi
vida.

Al ser que me apoya incondicionalmente
en todo momento, gracias por tu amor,
comprensión, dedicación y palabras de aliento.

IVONNE

A Dios por su inmenso amor y por permitirme
llegar a alcanzar este logro profesional.

A mis padres Julio y Genoveva por su apoyo
incondicional en todos los momentos de mi vida
y por su amor día a día.

A mis hermanos Milagros y Omar por su constante apoyo
y cariño desinteresado.

A los profesores de la facultad por sus
consejos y enseñanzas impartidas en
toda mi vida universitaria.

KAREN

AGRADECIMIENTOS

A nuestra asesora **Q.F. María Elena Salazar Salvatierra** por sus valiosos consejos y apoyo incondicional para la culminación de nuestro trabajo de tesis.

Al Instituto de Investigación de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “**MARCO ANTONIO GARRIDO MALO**” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM que nos brindaron todas las facilidades para el desarrollo de esta investigación y en especial a los doctores del instituto.

INDICE

	Pág.
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. GENERALIDADES.....	12
1. Maca.....	12
1.1 Etimología	
1.2 Descripción botánica	
1.3 Ubicación geográfica	
1.4 Clasificación taxonómica	
1.5 Etnomedicina y folcklore	
1.6 Maca como alimento	
1.7 Uso popular actual	
2. Control de calidad.....	16
3. Calidad Microbiológica.....	17
3.1 Contaminación microbiana por la materia prima	
3.2 Contaminación microbiana por el equipo	
3.3 Contaminación microbiana por el envase	
3.4 Contaminación microbiana por las condiciones de almacenamiento	
4. Control de calidad de productos naturales de uso en salud en Perú.....	21

5.	Registro sanitario de recursos y productos naturales de uso en salud.....	23
6.	Placas Petrifilm®.....	25
6.1	Composición de las Placas Petrifilm®	
6.2	Tipos de placas Petrifilm®	
III.	PARTE EXPERIMENTAL.....	41
1.	Equipos, materiales, medios de cultivo y reactivos.....	41
2.	Metodología.....	42
3.	Procedimiento.....	44
IV.	RESULTADOS.....	49
V.	DISCUSIÓN.....	61
VI.	CONCLUSIONES.....	64
VII.	RECOMENDACIONES.....	65
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	66
IX.	ANEXOS.....	72

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo consistió en la comparación de dos metodologías de recuento microbiano en productos derivados de la maca: el método de recuento en placa Petrifilm® y método convencional descrito en la monografía oficial de la Farmacopea Europea 2005 – 5ta Edición, y la determinación de la aplicabilidad de las placa Petrifilm® como método alternativo. Se realizó el estudio de 40 muestras de productos derivados de la maca que fueron adquiridas en diferentes puntos de venta ubicados en el centro de Lima, del análisis de regresión del \log_{10} del recuento de aerobios por el método convencional versus el \log_{10} del recuento por placas Petrifilm® se obtuvo una correlación de 0.99946 entre ambos métodos. Y del análisis de regresión para el recuento de Levaduras y Mohos se obtuvo una correlación de 0.98681 entre ambos métodos, de los resultados obtenidos se concluye que no existe diferencia significativa entre cada uno de los métodos empleados. Respecto a los límites microbiológicos dado por la OMS se encontró que el 85% de las muestras evaluadas no cumplían con los límites permisibles para el recuento microbiano. Además las placas Petrifilm® nos ofrecen las ventajas de fácil uso, disminución de costos, tiempo y personal, aumentando la productividad laboral por lo que su uso podría considerarse como método alternativo para el recuento microbiano de los productos derivados de la maca.

Palabras clave: Derivados de la maca, Recuento microbiano, Petrifilm®.

SUMMARY

The objective of the present work is about comparison between microbial recuent on derivades maca products: the Petrifilm® plates count method and conventional method described en Official monography from Europe Pharmacopeia 2005 5th Edition and the aplicable determination of petrifilm plates like alternative method. Was realized a study about 40 samples of derivated maca products which were adquired at differents places located in the downtown, regression test of \log_{10} and recuent of aerobios by conventional methods versus \log_{10} recuent of the Petrifilm® plates count which has been gotten a correlation of 0.99946 between those methods and the regression analysis to recuent yeast and moold which was got a correlation of 0.98681 between those methods. The gotten results conclude that mot exist significative differences between each other used methods, about microbiologics limits given by the OMS was found 85% of the evaluated samples didn't do with permisibles limits to microbial recuents. Also Petrifilm® plates offer us some advantages of the easy way, costs reduced, time and staffs increasing laboral productivity which was used. On the other hand it could be considered as alternative method in order to microbial recuent from maca derivated products.

Key words: maca derivated products, microbial recuent, Petrifilm®.

I. INTRODUCCIÓN

Se llaman plantas medicinales a los vegetales que tienen sustancias denominadas principios activos, las cuales ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su principal utilidad, a veces específica, es la de servir como droga o medicina que en algunos casos alivie la enfermedad o restablezca la salud ⁽³¹⁾.

Las plantas medicinales han servido al hombre durante miles de años para curar sus enfermedades. Sus secretos curativos fueron descubiertos por hombres que se encargaron de transmitir estos conocimientos de generación en generación ⁽³⁰⁾.

La demanda mundial de plantas medicinales y aromáticas se ha incrementado de manera vertiginosa en los últimos años, de ahí el surgimiento de las buenas prácticas fitosanitarias para que la droga vegetal tenga calidad terapéutica. La desinfección de las plantas medicinales surge por tanto como una necesidad de proveer insumos terapéuticos microbiológicamente seguros, con los requisitos exigidos para su comercialización, tanto como droga seca o como materia prima para la elaboración de fitofármacos libres de microorganismos patógenos que aseguren su calidad.

La flora peruana es conocida no sólo por la variedad de sus especies sino también por las propiedades terapéuticas que estas poseen, debido a ello en los últimos años se ha dado gran impulso a la investigación y desarrollo de diversas formas de presentación. Por esta razón, es necesario se realicen los respectivos análisis de control de calidad, para su salida al mercado nacional e internacional.

En el momento actual, la mayor parte de los productos terapéuticos naturales extranjeros se acogen a la farmacopea herbolaria del país al cual corresponden. No sucede la misma situación con los productos terapéuticos naturales que incluyen plantas medicinales peruanas, fabricados y distribuidos localmente. En la mayoría de estos productos, no se cuenta con la monografía farmacéutica de dichos productos, y no existe una farmacopea de plantas medicinales peruanas. Por tanto en el caso de los productos peruanos el control de calidad deberá efectuarse utilizando el protocolo del fabricante y las metodologías analíticas propias para cada caso en particular.

Motivó este trabajo la necesidad de encontrar métodos alternativos para el control microbiológico de Productos Terapéuticos Naturales que puedan ser utilizados en los procesos de industrialización y en los productos comercializados, que ofrezcan ventajas como disminución de tiempo, personal y costo, con respecto a los métodos oficiales convencionales. Es en esta circunstancia que se hace indispensable recomendar el uso de métodos analíticos rápidos y de bajo costo.

En tal sentido, para el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinación del Recuento Microbiano por el Método Convencional y el Método de Recuento en Placas Petrifilm® en productos derivados de la maca (polvo, tabletas, cápsulas y jarabes).

- Comparar la efectividad de las Placas Petrifilm® en el recuento microbiano respecto al método convencional en los productos derivados de la maca (polvo, tabletas, cápsulas y jarabes).
- Determinar la aplicabilidad de las Placas Petrifilm® para su uso en el recuento de bacterias aerobias, levaduras y mohos en productos derivados de la maca (polvo, tabletas, cápsulas y jarabes).

II. GENERALIDADES

1. MACA

1.1 Etimología: El nombre de la maca, según Pulgar Vidal (1985), proviene de dos voces de la lengua Chibcha: *Ma*, que indica originario de altura, y *Ca*, que significa alto, excelso, comida buena que fortalece ⁽²⁰⁾.

En el periodo Preinca, tuvo gran importancia y se convirtió en una de las primeras raíces que el poblador peruano consumió. Durante la época incaica no sólo se convirtió en alimentos de nobles, sino que servía también de ofrenda a los dioses.

A la llegada de los españoles, la maca era un producto de mucha importancia entre los pobladores del Imperio Incaico; fue usada por los conquistadores para mejorar la fertilidad de las yeguas y cerdos ⁽²⁰⁾.

1.2 Descripción Botánica: La maca (*Lepidium meyenii Walpers*) es una planta herbácea anual, de porte arrosetado, raíz napiforme, tuberosa, de consistencia dura que es la parte comestible, con gran contenido de féculas de forma redondeada, de 4 a 7 cm de longitud y de 3 a 5 cm de diámetro, en la parte más ensanchada ⁽²³⁾. Los ecotipos más importantes son de color amarillo, negro, rojo y morado ⁽²²⁾. Las semillas de la maca son ovoides, de color rojizo gris, de 2 a 2,5 mm, los hipocótilos que son la parte comestible de la planta varía de 2 y 5 cm. en tamaño. La pulpa es blanca – perla y tiene apariencia marmórea. Se compone de dos partes regulares bien definidas: una región exterior y una

cilíndrica central. La sección exterior es rica en azúcares, la sección interior es firme y rica en almidones.

Las hojas son arrosetadas y compuestas, presenta flores hermafroditas, actinoformas, muy pequeñas, de color verde claro. El fruto es silicua, con una sola semilla en cada celda ⁽²⁴⁾.

1.3 Ubicación Geográfica: La maca, *Lepidium meyenii Walpers*, es una especie nativa de los andes peruanos que se cultiva principalmente en la zona de la meseta de Bombón en el Departamento de Junín, entre los 3700 y 4500 m.s.n.m., región que presenta un clima agreste y temperaturas extremas de – 10º C. Conocida y empleada desde los tiempos precolombinos principalmente como una planta medicinal y/o alimenticia, la medicina tradicional peruana hace mención de sus principales propiedades como estimulante de la reproducción y energizante o revitalizadora ⁽²⁴⁾.

1.4 Clasificación Taxonómica:

División	ANGIOSPERMAE
Clase	DICOTYLEDONEAE
Subclase	ARCHICHLAMIDEAE
Orden	PAPAVERAES
Familia	BRASSICACEAE
Género	<i>Lepidium</i>
Especie	<i>Lepidium meyenii Walpers</i> ^(*)
Nombre vulgar	Maca, maca maca, maini.

Fuente: De acuerdo al sistema de clasificación de Engler & Prantl, modificado por Melchior en 1964⁽²⁴⁾.

(*) Actualmente se considera también la determinación de *Lepidium peruvianum*, pero no se encuentra oficializada, conservándose la denominación de *Lepidium meyenii Walpers*.

La maca está considerada como la única especie del género *Lepidium* domesticada en los andes. Las otras especies de este género en la zona andina son silvestres y usualmente consideradas como malezas de otras plantas cultivadas ⁽²⁴⁾.

Etnomedicina y Folklore: Propiedades de la maca en la tradición andina:

- **Fertilizante:** Es la principal cualidad atribuida a esta planta, ya desde la época prehispánica, motivo por el que se hallaba en la categoría de mágica dentro de los ritos de los incas. Esta cualidad indudablemente se halla relacionada principalmente a sus componentes menores o metabolitos secundarios (glucosinolatos) ⁽²²⁾:
- **Afrodisíaco:** Un afrodisíaco es cualquier sustancia que excita el apetito sexual. Es la segunda acción que se le atribuye, paralelamente a la de fertilizante igual que en esta existen muchos artículos afirmando dicha acción, algunos para solucionar la frigidez, otros como remedio para la impotencia ⁽²²⁾.
- **Reguladora y revitalizante:** Se utiliza tradicionalmente para regularizar alteraciones de la menstruación, también para atenuar algunos síntomas

y signos de la menopausia, así como casos de insomnio. Igualmente se afirma que personas con cierto deterioro de algún órgano superan su deficiencia con el consumo rutinario de maca. También se recomienda en la desnutrición, convalecencia, pérdida de memoria, cansancio, debilidad mental, como tónico general y geriátrico.

Algunos herbolarios recomiendan no utilizar maca en personas con hipertensión arterial, sin embargo esta contraindicación no ha sido todavía probada científicamente ⁽²²⁾.

1.6 Maca como Alimento: En el Folklore andino:

- “Huatia”: es el asado de las raíces frescas de maca
- “Atunca”: es el antiquísimo “pan de maca” ⁽²²⁾

1.7 Uso Popular Actual

Se han hecho populares en los últimos años diversos preparados que contienen determinadas concentraciones de maca en jugos, licores y otros productos que también se expenden en Lima y otras ciudades peruanas. Pero definitivamente la forma de presentación que ha invadido el mercado nacional son los frascos de cápsulas y tabletas, por su fácil ingesta ⁽²²⁾.

2. CONTROL DE CALIDAD

La OMS recomienda que se establezcan criterios científicos y métodos que aseguren la calidad y eficacia de las preparaciones obtenidas a partir de plantas medicinales. Para la industria farmacéutica las plantas medicinales son una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos, que son utilizables directamente y que permiten obtener productos farmacéuticos con menores efectos secundarios. La utilización tradicional de plantas medicinales, sumada a los avances en tecnología, ha permitido generar diversos productos de calidad uniforme, eficaces y seguros ⁽²⁶⁾.

La preocupación de fabricantes y consumidores en general sobre los temas de calidad se ha incrementado. Especialmente a partir de los años 80 cuando se ha desarrollado la concienciación de la calidad a todos los niveles de la sociedad, de manera que hoy en día la calidad de los productos farmacéuticos y alimenticios, es más que un deseo, una necesidad. Actualmente un indicador de producto bueno e inocuo es la incorporación de sistemas de calidad contrastados, que sean capaces de generar confianza en el consumidor ⁽¹⁹⁾.

Controlar la calidad es el proceso a través del cual podemos medir la calidad real, compararla con las normas existentes y actuar sobre las diferencias. El primer paso importante para la planificación de la calidad, es la redacción de las especificaciones de calidad para cada producto.

3. CALIDAD MICROBIOLÓGICA

En la producción de fitofármacos se aplica el concepto de control de calidad integral que corresponde al conjunto de procedimientos que se deben considerar en su fabricación, que incluye desde la recepción de la materia prima hasta el material de envase, siguiendo el flujo de fabricación de acuerdo a lo establecido por las normas de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Es así como el control de calidad se debe aplicar en las etapas de recepción de materias primas y envases, manufactura, en producto intermedio, en producto terminado, en almacenamiento y distribución ⁽²⁶⁾.

El control microbiológico en la maca y sus derivados refleja la calidad de los productos naturales ya que para considerarse apta para el consumo humano debe cumplir con las especificaciones microbiológicas establecidas, de ahí la importancia que estos productos lleguen a la población con un control adecuado que garantice su inocuidad.

Las diferentes productos derivados de maca que presenten recuento microbiano fuera de especificación podrían sufrir alteración de los componentes, esto implicaría alteración de la estabilidad del producto, que al llegar al consumidor podría ser causa de infecciones que dependería del número y tipo de contaminante.

Se han encontrado trabajos que reportan la calidad microbiológica de plantas medicinales que nos lleva a reflexionar sobre la importancia del estudio de la calidad microbiológica de los mismos ⁽⁴⁾.

La presencia de microorganismos en los productos naturales se debe a la infiltración de microbios de diversas maneras:

- Por transferencia de la carga microbiana de la materia prima
- Por transferencia de la carga microbiana de los equipos empleados en el proceso de manufactura.
- Por contacto entre el producto terminado y sus contenedores
- Por las condiciones de almacenamiento ⁽²⁶⁾.

3.1 Contaminación microbiana por la materia prima: Los insumos que provienen de origen vegetal son recolectados en el campo, por lo que suelen presentar alta contaminación de microorganismos, los propios de la planta y del suelo, y los del medio ambiente en que se desarrollan: polvo, insectos, hongos, materias fecales de animales, pesticidas, también el empleo de agua no apta microbiológicamente o contaminada con metales pesados como Pb, Mn, Ni, Cr, etc, componen la fuente de contaminación de las mismas ⁽²⁷⁾.

Ahora bien, como dicho material vegetal constituye un sustrato apropiado y muchos de los microorganismos presentes son capaces de sobrevivir a los procesos de secado utilizados, resulta que de forma general su recuento microbiano es elevado, compuestos en un alto porcentaje por bacterias

mesófilas aerobias, entre los que destacan las formadoras de esporas, lo que explica su supervivencia a pesar del proceso de secado.

Por tal motivo los problemas de contaminación y consecuentemente las pérdidas de materias primas vegetales han ido en aumento, por lo que la estrategia para solucionar dicha problemática debe tomar en consideración entre las soluciones propuestas la desinfección de las plantas mediante métodos aprobados por la OMS. Durante muchos años se han desarrollado métodos de desinfección química y más recientemente métodos físicos mediante la utilización de la energía de radiación de los rayos gamma que junto a otras técnicas de ionización constituyen un nuevo procedimiento con gran diversidad de aplicaciones industriales, especialmente en la industria de fitofármacos ⁽²⁷⁾.

La desinfección química puede ser con sales clorinadas como el hipoclorito de sodio o de calcio, para la reducción de la población microbiana se emplean dosis mínimas, entre 0,5 – 2,0% y el tiempo de inmersión es también breve, entre 5 y 10 minutos. Es de destacar que se prefiere la sal de sodio por ser más soluble que la de calcio, la que deja en la droga una capa blancuzca, que le proporciona un aspecto no adecuado ⁽³³⁾. Previa a la desinfección se requiere del lavado del material, lo que consiste en lavarlo con abundante agua potable, es decir, agua que debe reunir las condiciones químicas y microbiológicas adecuadas para que la misma no constituya una vía de contaminación ⁽²⁷⁾.

La desinfección física viene a estar dada por la ionización, utilizando la energía de radiación de los rayos gamma, es una tecnología simple y segura. Consiste en que los productos envasados o a granel pasan a través de un campo de radiación dentro de una cámara de irradiación, a una velocidad controlada para asegurar la correcta cantidad de energía y está basada en que inhibe muy eficientemente la síntesis del ADN en las células viables de las poblaciones microbianas. Es de destacar que estas fuentes no convierten el material en radioactivo, no existe transferencia de calor al producto lo que constituye una gran ventaja en el caso droga vegetal termosensible, no deja residuos, es inocuo y no contamina el medio ambiente. El tiempo de exposición es el que determina la dosis de ionización absorbida, por lo que resulta un proceso de fácil control para asegurar su confiabilidad y repetitividad ⁽²⁷⁾.

Por lo tanto en la fabricación de los diversos productos es necesario asegurar que la materia prima utilizada no presente contenido microbiano o en su defecto que cumpla con las especificaciones permisibles.

3.2 Contaminación microbiana por el equipo: Los equipos usados deben ser sometidos a una sanitización rigurosa para poder erradicar la presencia de cualquier tipo de microorganismo, esta contaminación se puede deber a encapsuladoras, tableteadoras, tanques que se usan en los diversos procesos de manufactura ⁽²⁶⁾.

3.3 Contaminación microbiana por el envase: En el proceso de envasado es necesario asegurarse que los envases no presenten carga microbiana, aún

cuando el proceso de manufactura se haya realizado de forma aséptica un envase contaminado es una gran fuente de contaminación. Por lo que es necesario someter a controles microbiológicos a todo material dispuesto a ser usado para el envasado de los productos ⁽²⁶⁾.

3.4 Contaminación microbiana por las condiciones de almacenamiento: El producto terminado debe almacenarse en condiciones óptimas de temperatura y humedad controlada ⁽²⁶⁾.

4. CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS NATURALES DE USO EN SALUD EN EL PERÚ

En el Perú, el empleo de preparados fabricados a partir de productos naturales principalmente de origen vegetal se encuentra ampliamente difundido, sin embargo poco se ha avanzado en el área de control de calidad, por lo que ésta es aún hoy en día una necesidad ampliamente reconocida. En consecuencia no se cuenta aún con un sistema de control de calidad apropiado para este tipo de productos ⁽¹⁾.

Técnicas de Análisis del Producto: Las técnicas analíticas a emplearse en el análisis de control de calidad, deberán ser reproducibles, estar validadas y ser ejecutadas por personal capacitado e idóneo para la ejecución de los ensayos.

Deberán contemplarse las siguientes recomendaciones generales:

- Si utiliza una de las Farmacopeas, bastará con indicarlo.
- De lo contrario, deberá anexarse la documentación que compruebe la validación respectiva.

Las técnicas propuestas deben permitir el control de la identidad del (los) recurso(s) natural(es) de uso medicinal constituyente(s) del medicamento natural.

Entre los métodos aplicables se incluyen: organolépticos, macroscópicos, microbiológicos, microscópicos (histológicos), físicos y químicos ⁽¹⁾.

Control de la Inocuidad: Entendiéndose la inocuidad como el requisito de que el producto administrado no debe de producir efectos tóxicos o deletéreos para la salud del usuario. En términos prácticos se recomienda determinar la dosis letal media (DL50) en un modelo animal, utilizando la vía adecuada para la presentación y forma de uso del producto (oral, intravenosa, intraperitoneal o dérmica). Se determinará la DL 50 y la DL 5 en ratones, con un nivel de confianza no menor del 95% y una precisión del $\pm 2,5\%$. Con frecuencia se utiliza ratones o ratas en experimentos de una duración de 7 días o menos ⁽¹⁾.

Control microbiológico: Son aplicables los métodos de inoculación directa en placa ó tubo. El producto no debe de ser portador de gérmenes infecto contagiosos. El recuento microbiano o fúngico no deberá exceder los límites recomendados por la Organización Mundial de la Salud para productos medicinales herbales de uso oral ⁽¹⁾.

Respecto a la calidad microbiológica, la OMS establece los límites permitidos para formas orales.

Tabla Nº 1: Límites microbiológico recomendados para formas orales por la Organización Mundial de la Salud:

AGENTE BIOLÓGICO	REQUISITO OMS DE FORMAS ORALES
Bacterias aeróbicas	No más de 10,000 ufc por 1 g o mL
Hongos	No más de 100 ufc por 1 g o mL
Enterobacterias y algunas otras bacterias Gram negativas	No más de 100 ufc por 1 g ó mL
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia en 10 g ó 10mL
<i>E. coli</i>	Ausencia en 1 g ó 1 mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en 1 g ó 1mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia en 1 g ó 1mL

Fuente: Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud Centro Nacional de Control de Calidad. Registro y Control de Calidad de Recursos y Productos Naturales de Uso en Salud. Serie de documentos Nº 9. (1999)

5. REGISTRO SANITARIO DE RECURSOS Y PRODUCTOS NATURALES DE USO EN SALUD

La reglamentación sanitaria de los Recursos y Productos Naturales se rige por las medidas dispuestas en el artículo 63 de la Ley General de Salud, Ley Nº 26842, en relación a la comercialización de las plantas medicinales y sus preparados; y, por el Reglamento aprobado por Decreto Supremo Nº 010-97-SA del 24 de diciembre de 1997, el cual establece los requisitos de obtención del Registro Sanitario de los Recursos y Productos Naturales de uso en Salud y las

acciones de control y vigilancia posterior al registro llevado a cabo por la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas ⁽¹⁾.

Para los efectos de obtención del Registro Sanitario se define al **Recurso Natural de uso en Salud** como todo material proveniente de organismos vivos y de minerales que posee actividad farmacológica comprobada y que para su comercialización es presentado sin haber sido sometido a procesos artificiales que alteren su composición natural y que es envasado sin forma farmacéutica. Los recursos naturales de uso en salud podrán ser comercializados sin Registro Sanitario siempre que en el rotulado de su envase no se haga referencia alguna a propiedades terapéuticas, diagnósticas y preventivas ⁽²⁵⁾.

Defínase como **Producto Natural de Uso en Salud** al producto medicinal con actividad farmacológica comprobada elaborado a partir del recurso natural de uso en salud, cuya sustancia o componente biológicamente activo corresponda a alguna de las partes de dicho recurso o es el resultado de asociaciones, combinaciones o mezclas de recursos en estado natural y que es presentado en una forma farmacéutica utilizándose con fines terapéuticos ⁽²⁵⁾.

El Registro Sanitario para productos naturales de uso en salud, será otorgado por producto, concentración, forma farmacéutica y por fabricante. La comercialización de los productos naturales de uso en salud se hará bajo prescripción médica o sin ella, de conformidad con lo que se determine al otorgarse el Registro Sanitario. Se deberá adjuntar a la solicitud de registro sanitario el protocolo de análisis incluyendo especificaciones técnicas,

resultados y métodos analíticos. Asimismo deberá incluir los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de cada uno de los recursos vegetales empleados en su fórmula ⁽²⁵⁾.

6. PLACAS PETRIFILM®

Las placas Petrifilm® son un método rápido que proporciona resultados más rápidos, fueron desarrollados en el campo de la microbiología para simplificar los procedimientos de recuento microbiológico. Su constitución lo hace un método fiable para la detección de la contaminación microbiana de materias primas, productos terminados, además pueden ser empleadas para control ambiental ⁽¹⁰⁾.

6.1 COMPOSICIÓN DE PLACAS PETRIFILM®⁽¹⁰⁾ (Ver figura N° 1)

Las placas Petrifilm® están constituidas básicamente por:

- Película de polipropileno
- Indicador
- Gel soluble en agua
- Medios nutritivos deshidratados
- Papel con cuadrícula impresa

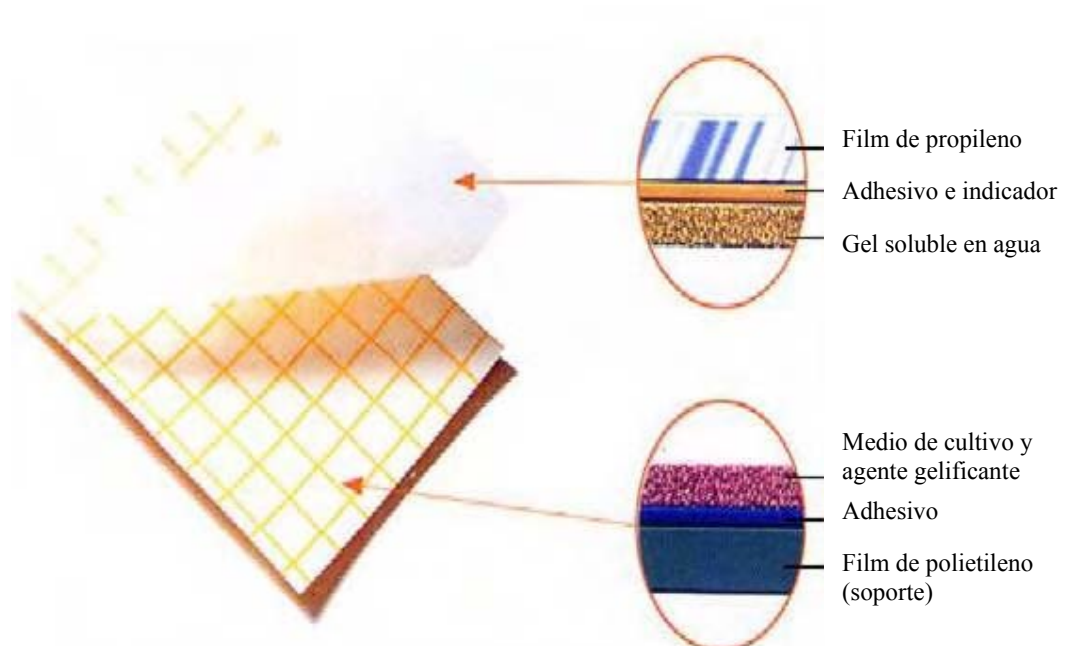
6.2 TIPOS DE PLACAS PETRIFILM®⁽¹⁰⁾

Las placas petrifilm® disponibles son:

- A. Placa para el recuento de Bacterias Aerobias

- B. Placa para el recuento de Levaduras y Mohos
- C. Placa para el recuento de Coliformes
- D. Placa Alta Sensibilidad para el recuento rápido de Coliformes
- E. Placa para el recuento de Enterobacteriaceae
- F. Placa para el recuento *E. Coli* y Coliformes
- G. Placa Petrifilm® de Staph Express para recuento de *Staphylococcus aureus*.

Figura Nº 1: Composición de una placa Petrifilm®



A. PLACA PETRIFILM® PARA EL RECuento DE AEROBIOS

Las placas Petrifilm® para el Recuento Total de Aerobios constituyen un sistema listo para usar que contiene los elementos nutritivos del medio para métodos estándar, un agente gelificante y un indicador químico ⁽¹⁰⁾.

1. COMPOSICIÓN

La placa Petrifilm® para Recuento Total de Aerobios está compuesta por:

Film inferior que consta de una lámina de papel con una cuadrícula impresa recubierta de polipropileno sobre la cual se encuentra el medio de cultivo conteniendo nutrientes del medio para métodos estándar y un agente gelificante soluble en agua fría.

Film superior que consta de otra lámina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría que permite una gelificación rápida.

Indicador de color 2,3,5 tricloruro de trifeniltetrazolio (TTC) que vira a rojo debido a su reducción por los microorganismos ⁽¹¹⁾.

2. MODO DE EMPLEO

Colocar la placa Petrifilm® en una superficie plana. Levantar el film superior y con una pipeta en posición perpendicular a la placa colocar 1 mL de muestra previamente preparada en el centro del film inferior.

Bajar con cuidado el film superior, evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer.

Colocar el difusor de plástico con la cara lisa hacia arriba, presionar con cuidado para lograr difundir la muestra sobre el área circular. Esperar 2 minutos para que gelifique el agar.

Incubar las placas a 37 °C después de 48 a 72 horas proceder al recuento de las colonias ⁽¹¹⁾.

3. INTERPRETACIÓN

Tras incubación las colonias aparecen de color rojo. La intensidad de la coloración y el tamaño de las colonias dependen de las bacterias consideradas ⁽¹¹⁾.

B. PLACA PETRIFILM® PARA EL RECUESTO DE LEVADURAS Y MOHOS

Las placas Petrifilm® para el Recuento de Levaduras y Mohos constituyen un sistema listo para usar que contienen nutrientes suplementados con antibióticos, un agente gelificante y un indicador químico ⁽¹⁰⁾.

1. COMPOSICIÓN:

La placa Petrifilm® para Recuento de Levaduras y Mohos, está compuesta por:
Film inferior que consta de una lámina de papel con una cuadrícula impresa recubierta de polipropileno sobre la cual se encuentra el medio de cultivo conteniendo nutrientes del agar infusión de corazón de Sabouraud “Sabhi”, dos antibióticos (clorotetraciclina y cloramfenicol), indicador de fosfatos BCIP (5-

bromo-4-cloro-3-indoxil-fosfato) y un agente gelificante soluble en agua fría. El film superior permeable favorece la difusión del oxígeno durante el desarrollo de los microorganismos.

Film superior que consta de otra lámina de polipropileno que contiene nuevamente los dos antibióticos (clorotetraciclina y cloramfenicol), indicador 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-fosfato (BCIP) y gel soluble en agua fría que permite una gelificación rápida. Durante la incubación la clorotetraciclina y el cloramfenicol difunden desde la capa de adhesivo al medio nutritivo para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes. Este film y la membrana intermedia microporosa permiten una perfecta oxigenación del gel durante la incubación. La composición del gel ha sido especialmente diseñada para limitar la invasión de la placa por los hongos.

Indicador 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-fosfato (BCIP) que provoca una precipitación azul en presencia de fosfatasa. Esta enzima es producida por hongos y levaduras en la mayoría de los casos ⁽¹²⁾.

2. MODO DE EMPLEO

Colocar la placa Petrifilm® en una superficie plana. Levantar el film superior y con una pipeta en posición perpendicular a la placa colocar 1 mL de muestra previamente preparada en el centro del film inferior.

Bajar con cuidado el film superior, evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer.

Colocar el difusor de plástico (específico para Levaduras y Mohos) con la cara lisa hacia abajo, presionar con cuidado para lograr difundir la muestra sobre el

área circular. No girar ni deslizar el aplicador. Esperar dos minutos para que solidifique el gel.

Incubar las placas cara arriba a temperatura de 25 °C después de 3 a 5 días proceder al recuento de las colonias ⁽¹²⁾.

3. INTERPRETACIÓN

Tras incubación las levaduras forman:

- Colonias pequeñas
- Las colonias tienen bordes definidos
- De color rosa-tostado a azul verdoso
- Generalmente no tienen un foco (centro negro) en el centro de la colonia.

Y los mohos presentan:

- Colonias grandes
- Las colonias tienen bordes difusos
- Color variable (los mohos pueden producir sus propios pigmentos)
- Las colonias son planas
- Generalmente con un foco en el centro de la colonia ⁽¹²⁾.

C. PLACA PETRIFILM® PARA EL RECUESTO DE COLIFORMES

Las placas Petrifilm® para el Recuento de Coliformes constituyen un sistema listo para usar que se presenta en forma de dos láminas de plástico que contienen todos los elementos nutritivos y los indicadores necesarios para la búsqueda y el recuento de coniformes ⁽¹⁰⁾.

1. COMPOSICIÓN:

La placa Petrifilm® para Recuento de Coliformes está compuesta por:

Film inferior está recubierto por un medio de cultivo VRBL (Cristal violeta, bilis, rojo neutro, lactosa): las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de los gérmenes Gram + contaminantes. Este film es impermeable para limitar el desarrollo de los microorganismos aerobios estrictos.

Film superior que consta de otra lámina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría que permite una gelificación rápida.

Indicador de color 2,3,5 tricloruro de trifeniltetrazolio (TTC) que vira a rojo debido a su reducción por los microorganismos.

Un soporte blanco del film inferior forma una depresión circular que facilita la siembra.

El film superior permeable favorece la difusión del oxígeno aunque retiene el gas formado por los coliformes durante la fermentación de la lactosa.

La visualización de las burbujas de gas permite diferenciar los coliformes de otros microorganismos gram negativos ⁽¹⁴⁾.

2. MODO DE EMPLEO

Colocar la placa Petrifilm® en una superficie plana. Levantar el film superior y con una pipeta en posición perpendicular a la placa colocar 1 mL de muestra previamente preparada en el centro del film inferior. Bajar con cuidado el film superior, evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer.

Colocar el difusor de plástico con la cara lisa hacia abajo, presionar con cuidado para lograr difundir la muestra sobre el área circular. Esperar 2 minutos para que gelifique el agar.

Incubar las placas a 30 °C o a 44 °C después de 24 horas proceder al recuento de las colonias ⁽¹⁴⁾.

3. INTERPRETACIÓN

Tras incubación los coliformes forman colonias rojas con burbujas de gas (por la fermentación de la lactosa). Las colonias de bacterias no coliformes son rojas pero no están asociadas a burbujas de gas ⁽¹⁴⁾.

D. PLACA PETRIFILM® ALTA SENSIBILIDAD PARA EL RECUESTO RAPIDO DE COLIFORMES

El Petrifilm® Alta Sensibilidad para el Recuento Rápido de Coliformes es un sistema seguro y listo para usar en la enumeración de coliformes.

1. COMPOSICIÓN:

La placa Petrifilm® Serie 2000 Recuento Rápido de Coliformes está compuesta por:

Un film inferior que contiene un medio selectivo para coliformes (VRBL), posee un indicador de pH (rojo de fenol) para detectar la producción de ácido y un indicador como el TTC que tiñe las colonias facilitando la enumeración.

Las coliformes producen ácido y gas. A partir de la lactosa durante la fermentación metabólica. Como las colonias en crecimiento producen ácido, el indicador de pH cambia de rojo-naranja a amarillo dando una indicación presuntiva de coliformes.

El gas es atrapado alrededor de las colonias de coliformes y permite la detección de coliformes confirmativos ⁽¹⁶⁾.

2. MODO DE EMPLEO:

Colocar la placa Petrifilm® en una superficie plana, con una pipeta perpendicular a la placa colocar 5 mL de la muestra o del diluyente de la muestra en el centro del film inferior.

Bajar el film sobre la muestra con cuidado, evitando que la muestra salga de la placa y sin que queden burbujas de aire. No dejarlo caer.

Colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo. Distribuir la muestra presionando ligeramente sobre el soporte del aplicador.

Esperar 2 – 5 minutos a que solidifique el gel. Incubar las placas a 30 °C – 35 °C por 24 horas ⁽¹⁶⁾.

3. INTERPRETACION:

Un indicador rojo colorea todas las colonias y la película superior atrapa el gas producido por los coliformes.

Las coliformes producen colonias de color rojo asociadas con las burbujas de gas ⁽¹⁶⁾.

E. PLACA PETRIFILM® PARA EL RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE

Las placas Petrifilm® para el Recuento de Enterobacteriaceae es un análisis bacteriológico listo para usar que se presenta en forma de dos láminas plásticas que contienen todos los elementos nutritivos y las indicaciones necesarias para el recuento de Enterobacterias ⁽¹⁰⁾.

1. COMPOSICIÓN:

La placa Petrifilm® para Recuento de Enterobacteriaceae está compuesta por:

Film inferior que contiene los nutrientes del medio V.R.B.G. modificado (Cristal violeta, rojo neutro, bilis, glucosa).

Film superior que consta de un agente gelificante soluble en agua fría y adhesivos.

Indicador de color 2,3,5 tricloruro de trifeniltetrazolio: rojo de clorofenol (TTC) facilita la enumeración de enterobacterias pues vira a rojo al reducirse por acción de las colonias de microorganismos.

El film superior permeable favorece la difusión del oxígeno aunque retiene el gas formado algunas enterobacterias durante la fermentación de la glucosa ⁽¹³⁾.

2. MODO DE EMPLEO

Colocar la placa Petrifilm® en una superficie plana. Levantar el film superior y con una pipeta en posición perpendicular a la placa colocar 1 mL de muestra previamente preparada en el centro del film inferior.

Bajar con cuidado el film superior, evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer.

Colocar el difusor de plástico con la cara lisa hacia abajo, presionar con cuidado para lograr difundir la muestra sobre el área circular. Esperar 2 minutos para que solidifique el gel.

Incubar las placas a 35 °C – 37°C después de 24 a 48 horas proceder al recuento de las colonias ⁽¹³⁾.

3. INTERPRETACIÓN

Tras incubación las bacterias productoras de ácido aparecen como colonias rojas rodeadas por una zona amarilla asociada a la producción de ácido que es detectado por el indicador de pH del medio.

Las bacterias productoras de ácido y gas se consideran Enterobacterias, pueden tener diferentes características como: colonias asociadas a burbujas de gas, colonias rojas con zonas ácidas, colonias rojas asociadas a una zona ácida y a burbujas de gas ⁽¹³⁾.

F. PLACA PETRIFILM® PARA EL RECuento *E. Coli*

El Petrifilm® *E. Coli* es un análisis bacteriológico listo para usar que se presenta en forma de dos láminas plásticas que contienen todos los elementos nutritivos y los indicadores necesarios para la detección y recuento de *E. Coli* ⁽¹⁰⁾.

1. COMPOSICIÓN:

La placa Petrifilm® *E. Coli* está compuesta por:

El film inferior está recubierto por un medio de cultivo VRBL (Cristal violeta, bilis, rojo neutro, lactosa). Este film es impermeable para limitar el desarrollo de los microorganismos aerobios estrictos.

El indicador coloreado BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indoxyl-beta-D-glucoronidasa) que detecta la enzima glucoronidasa que lo produce específicamente *E. coli* en su mayoría¹.

El soporte blanco del film inferior forma una depresión circular que facilita la siembra.

El film superior, permeable favorece la difusión del oxígeno si bien retiene el gas formado por las coliformes en la fermentación de la lactosa.

El indicador de tetrazolium (TTC) facilita el recuento de otros microorganismos Gram negativos al virar a rojo ⁽¹⁵⁾.

2. MODO DE EMPLEO

Colocar el Petrifilm[®] sobre una superficie plana. Levantar el film superior y colocar 1 mL de la muestra a analizar en el centro del film inferior.

Recubrir con el film superior, extender la muestra con el difusor plástico (lado liso hacia abajo) ejerciendo una ligera presión.

El agua contenida en la muestra rehidrata los componentes y forma entre los dos films un gel de 20 cm². La gelificación se obtiene a los 2 minutos.

Incubar a 30° C o a 44°C (temperatura selectiva para *E. Coli*). Poner un recipiente con agua en la estufa cuando se incuba a una temperatura superior a 37°C. No apilar más de 20 unidades.

Hacer el recuento a las 24 horas. Proceder a una segunda lectura a las 48 horas si a las 24 horas las colonias son poco visibles ⁽¹⁵⁾.

¹ *E. coli* O 157: H7 es glucoronidasa negativa y no produce el precipitado azul.

3. INTERPRETACIÓN

Tras la incubación la *E. coli* forman colonias azules con burbujas de gas debido a la producción de glucoronidasa y a la fermentación de la lactosa. Los coliformes son rojos y con burbujas de gas ⁽¹⁵⁾.

G. PLACA PETRIFILM® DE STAPH EXPRESS PARA RECuento DE *Staphylococcus aureus*.

Las Placas Petrifilm® de Staph Express para Recuento de *Staphylococcus aureus* consiste en una Placa Petrifilm® de Recuento Staph Express y un Disco de Staph Express los cuales están empacados individualmente.

1. COMPOSICIÓN:

Las Placas Petrifilm® de Staph Express para recuento de *Staphylococcus aureus* consiste en un medio de cultivo listo para utilizarse el cual contiene un agente gelificante soluble en agua. El medio de cultivo modificado de Baird Parker, contiene un cromógeno en la placa el cual es selectivo y permite diferenciar al *Staphylococcus aureus*. El Disco de Staph Express contiene Azul de O – Toluidina el cual facilita la visualización de la reacción desoxirribonucleasa (Dnasa). Los organismos Dnasa - positivos detectados sobre la Placa Petrifilm® de Staph Express son el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus intermedius*. Estos tres organismos

comprenden la mayoría del grupo de organismos comúnmente conocidos como *Staphylococcus coagulasa* – positivo.

2. MODO DE EMPLEO

Colocar la Placa Petrifilm® de Staph Express® para recuento de *Staphylococcus aureus* sobre una superficie plana.

Levante la lámina superior y dispense 1 mL de la suspensión de la muestra en el centro de la lámina

Dejar caer la lámina hacia abajo sobre la muestra, evite la formación de burbujas de aire.

Inmediatamente coloque el esparcidor plano Petrifilm® sobre el centro de la superficie de la placa. Presione cuidadosamente sobre el centro y distribuya cuidadosamente la muestra. Distribuya el inóculo en la placa Petrifilm® de Staph Express® para recuento de *Staphylococcus aureus* sobre el área de crecimiento antes de que se forme el gel. No deslice el esparcidor a través de la lámina.

Remueva el esparcidor de la placa y espere que se gelatinice la placa.

Incube las placas horizontalmente, con el área limpia hacia arriba, por $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ó $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperatura basada en la referencia de la validación).

3. INTERPRETACIÓN

El recuento de las Placas Petrifilm® de Staph Express para Recuento de *Staphylococcus aureus* se realiza con un contador estándar de colonia u otro iluminador magnificante.

Observe las colonias de color: sino existen colonias o se encuentra presentes únicamente colonias de color rojo – violeta después de las 24 h \pm 2 h, recuento todas las colonias rojo – violeta como *S. aureus*.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. EQUIPOS, MATERIALES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Equipos

- Estufa (Modelo Húngaro con termostato digital).
- Potenciómetro Hanna Instrument H-221
- Microondas Myray Microwave Oven
- Autoclave FRAVILL
- Balanza Analítica DENVER Instrument XP-300
- Refrigeradora
- Mechero Bunsen
- Agitador rotatorio VORTEX

Materiales

- Micropipeta de 1000 μ L NICHIRYO OXFORD
- Tips de 1000 μ L
- Placas petri estériles de 15 x 100 mm. Pyrex®
- Frascos de vidrio con tapón de rosca de 250 y 250 mL.
- Probetas de 250, 500 y 1000 mL.
- Tubos de ensayo Pyrex® de 16 x 150 mm
- Guantes estériles
- Mascarillas asépticas

Reactivos

- Solución buffer patrón de pH 4 y pH 7 Merck

- Tween 80 Merck
- Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4) Merck
- Disodio hidrógeno fosfato dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Merck
- Cloruro de sodio (NaCl) Merck
- Peptona Merck

Medios de cultivo

- Agar Sabouraud 4% Glucosa Merck
- Agar Tripticasa Soya (TSA) Merck

Placas Petrifilm®:

- Placas Petrifilm® para el recuento de aerobios 3M
- Placas Petrifilm® para el recuento de Levaduras y Mohos 3M
- Difusor para las placas Petrifilm® para el recuento de aerobios
- Difusor para las placas Petrifilm® para el recuento de Levaduras y Mohos

2. METODOLOGÍA

2.1 MUESTREO

Se realizó el estudio de 40 muestras de productos derivados de la maca (Ver cuadro N° 1). Las muestras de los productos derivados de la maca fueron resultado de un muestreo aleatorio.

Las muestras se obtuvieron en lugares donde la comercialización es de forma ambulatoria.

2.2 LUGARES DE MUESTREO

- Galería “Nazarenas” sito en Av. Tacna N° 405.
- Mercado central, centro de Lima

CUADRO N° 1

PRESENTACION	MARCA	Nº DE MUESTRAS	TOTAL
Polvos	Maca Instantánea	2	16
	Maca de los andes	2	
	Maca Andina	2	
	Maca Keshua	2	
	Maca Vit	2	
	Maca Max	2	
	Vita Maca	2	
	Alta Natura Maca	2	
Cápsulas	Maca Forte	2	12
	Maca Sana Plant	2	
	Maca Vidax	2	
	Maca Vida Natural	2	
	Maca Impra	2	
	Maca Madre Selva	2	
Tabletas	Maca Cornature	2	4
	Macandina	2	
Jarabes	Tonico VITA MACA	2	8
	Jalea Real y Maca	2	
	Maca Power	2	
	Vita Maca	2	

3. PROCEDIMIENTO: Análisis Microbiológico

3.1 RECuento PRELIMINAR:

Se tomaron asépticamente 10g o 10mL de cada muestra disolviéndola en 90 mL de Buffer pH 7 con 0,5% de Tween 80 (para desactivar el sistema de preservantes que estuviera presente en la muestra).

Para el recuento se tomó 1 mL de la dilución anterior para hacer diluciones sucesivas (dilución 10^{-2} , dilución 10^{-3} , dilución 10^{-4} y dilución 10^{-5}) sembrando 1 mL de cada dilución por duplicado en cada uno de los medios:

- Agar Trypticase Soya (TSA): para el recuento de aerobios, incubar a 37° C x 48horas.
- Agar Sabouraud (AS): para el recuento de Levaduras y Mohos, incubar a 25° C x 5 días.

Este recuento preliminar de las muestras nos permitió establecer las diluciones que se usaron en el recuento de comparación entre el método convencional (Placas TSA y Agar Sabouraud) y el método de Placas Petrifilm®.

3.2 RECuento POR EL MÉTODO CONVENCIONAL Y EL MÉTODO DE PLACAS PETRIFILM®

(Ver esquema N° 1)

Para el recuento se usaron las diluciones establecidas para cada tipo de muestra, se usó como diluyente buffer pH 7 con 0,5% de Tween 80.

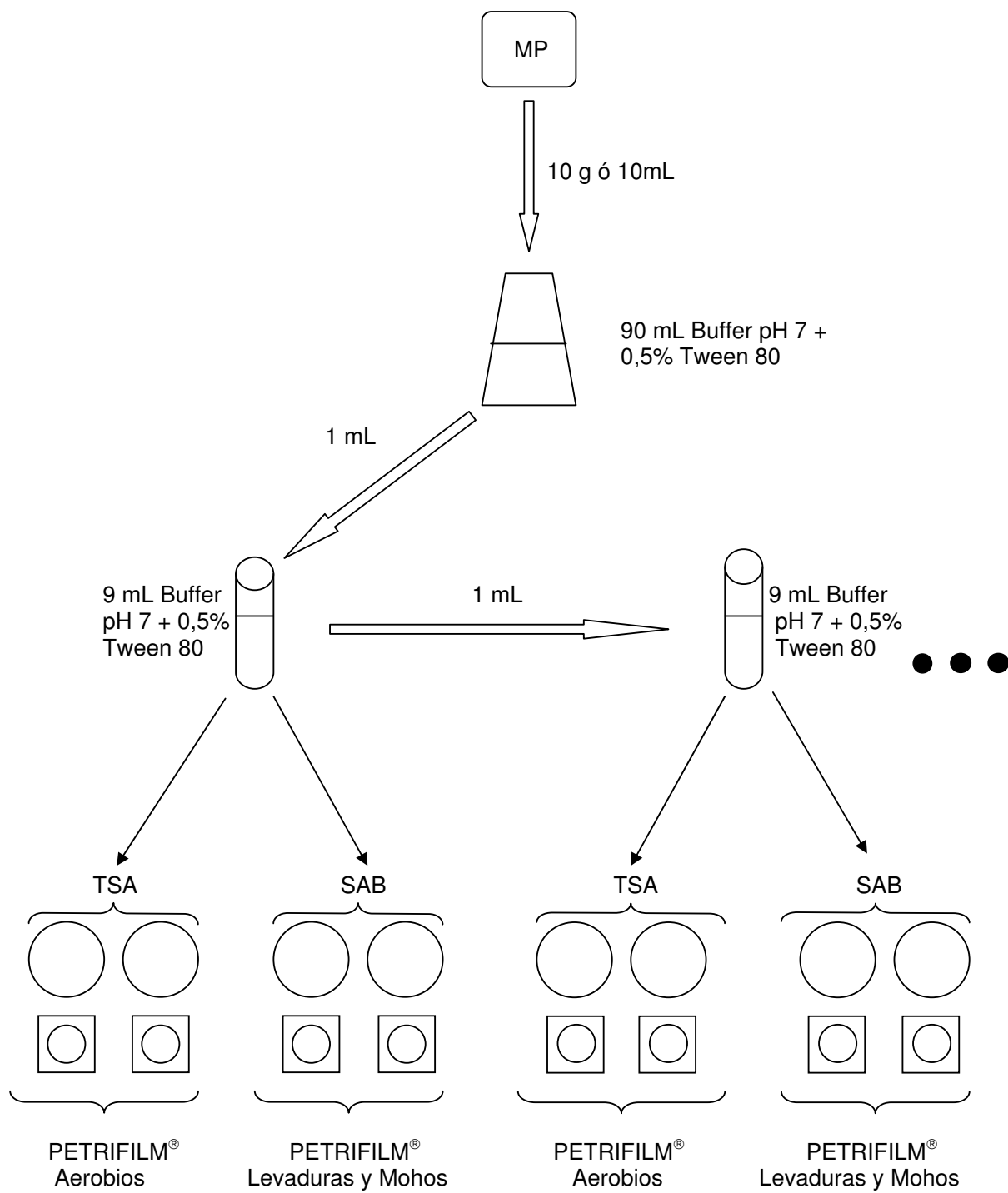
A partir de cada dilución se sembró 1 mL por duplicado en cada uno de los siguientes medios:

- Agar Trypticase Soya (TSA)
- Agar Sabouraud (AS)
- Placas Petrifilm® para el recuento de aerobios
- Placas Petrifilm® para el recuento de Levaduras y Mohos

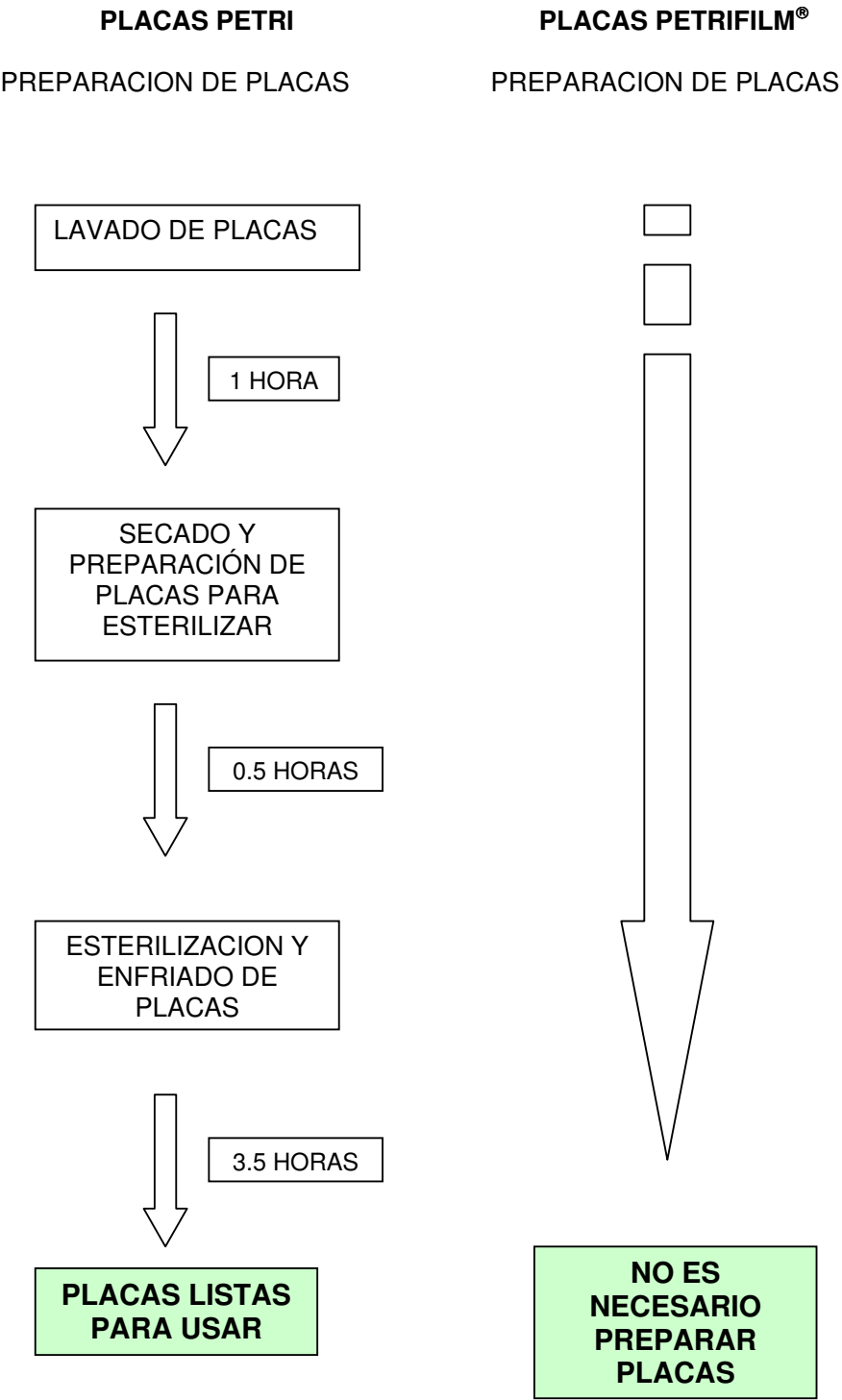
Las placas de Agar Trypticase Soya (TSA) y Placas Petrifilm® para recuento de aerobios se incubaron a 37 °C durante 48 horas, procediendo al conteo de colonias de color rojo en las placas Petrifilm® y en las placas de TSA se contaron todas las colonias.

Las placas de Agar Sabouraud (AS) y las Placas Petrifilm® para el recuento de Levaduras y Mohos se incubaron a 25°C durante 5 días procediendo al conteo de las colonias características.

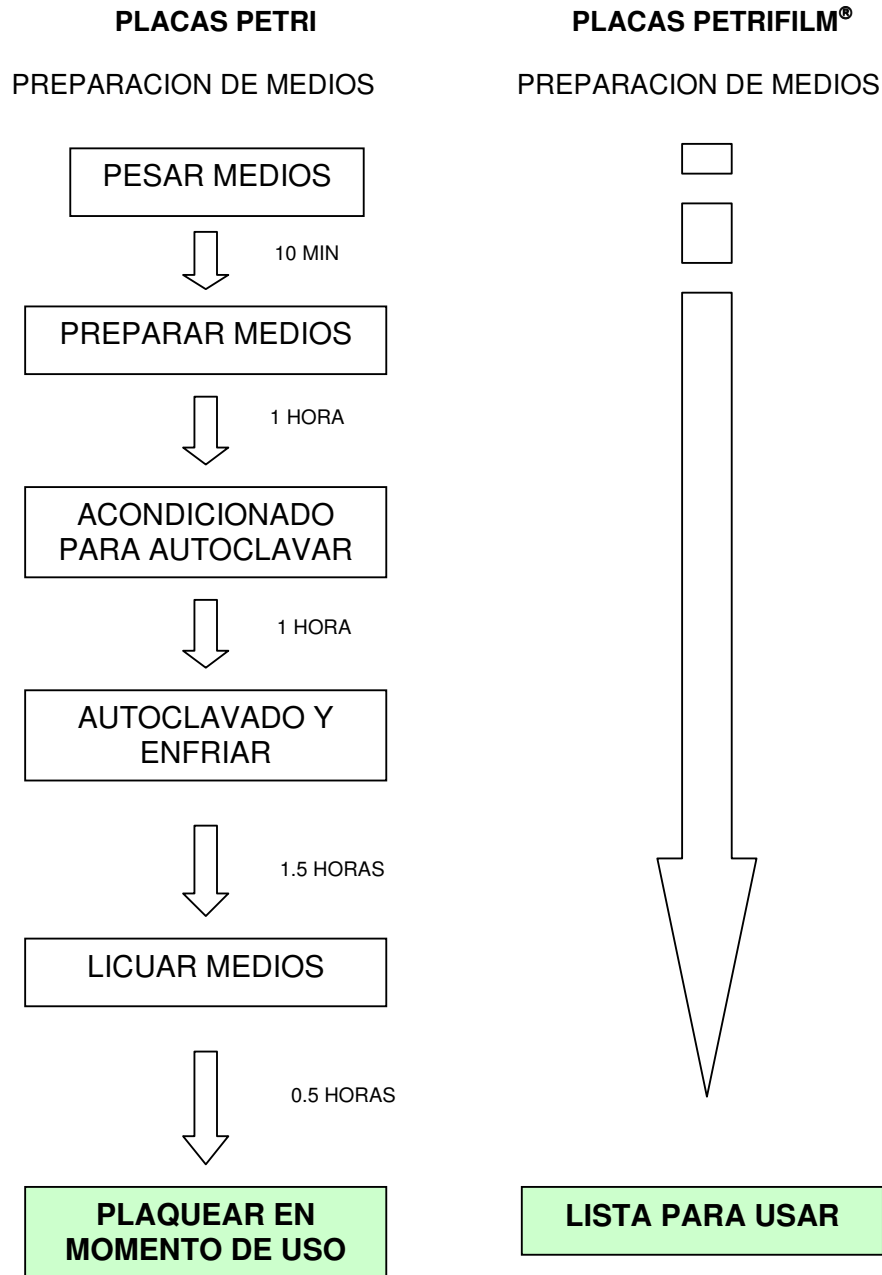
ESQUEMA N º 1



A. DIAGRAMA DE FLUJO DE PREPARACIÓN DE PLACAS PETRI VS PLACAS PETRIFILM®:



B. DIAGRAMA DE FLUJO DE PREPARACIÓN DE MEDIOS EN PLACAS PETRI VS PLACAS PETRIFILM®:

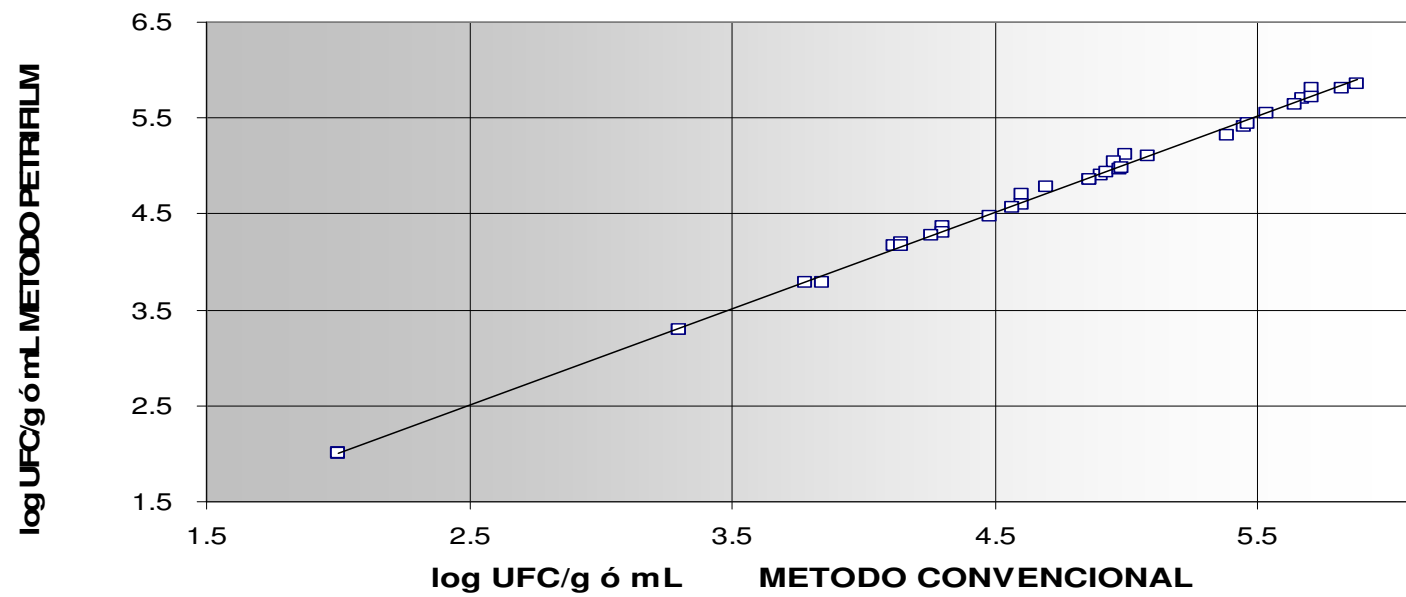


IV. RESULTADOS

Tabla N° 1: Resultado del recuento de aerobios de los productos derivados de la maca:

MUESTRA	METODO CONVENCIONAL UFC/g ó mL	log UFC/g ó mL	METODO PETRIFILM UFC/g ó mL	log UFC/g ó mL
	PROMEDIO		PROMEDIO	
1	51 x 10 ⁴	5.71	64 x 10 ⁴	5.81
2	40 x 10 ³	4.60	40 x 10 ³	4.60
3	20 x 10 ³	4.30	23 x 10 ³	4.36
4	10 x 10 ⁴	5.00	13 x 10 ⁴	5.11
5	7 x 10 ³	3.85	6 x 10 ³	3.78
6	47 x 10 ⁴	5.67	51 x 10 ⁴	5.71
7	8 x 10 ⁴	4.90	8 x 10 ⁴	4.90
8	2 x 10 ³	3.30	2 x 10 ³	3.30
9	84 x 10 ³	4.92	86 x 10 ³	4.93
10	121 x 10 ³	5.08	125 x 10 ³	5.10
11	72 x 10 ³	4.86	73 x 10 ³	4.86
12	1 x 10 ²	2.00	1 x 10 ²	2.00
13	20 x 10 ³	4.30	20 x 10 ³	4.30
14	13 x 10 ³	4.11	15 x 10 ³	4.18
15	1 x 10 ²	2.00	1 x 10 ²	2.00
16	4 x 10 ⁴	4.60	5 x 10 ⁴	4.70
17	1 x 10 ²	2.00	1 x 10 ²	2.00
18	75 x 10 ⁴	5.88	71 x 10 ⁴	5.85
19	28 x 10 ⁴	5.45	26 x 10 ⁴	5.41
20	34 x 10 ⁴	5.53	35 x 10 ⁴	5.54
21	44 x 10 ⁴	5.64	44 x 10 ⁴	5.64
22	37 x 10 ³	4.57	37 x 10 ³	4.57
23	14 x 10 ³	4.15	16 x 10 ³	4.20
24	9 x 10 ⁴	4.95	11 x 10 ⁴	5.04
25	6 x 10 ³	3.78	6 x 10 ³	3.78
26	24 x 10 ⁴	5.38	21 x 10 ⁴	5.32
27	5 x 10 ⁴	4.70	6 x 10 ⁴	4.78
28	2 x 10 ³	3.30	2 x 10 ³	3.30
29	94 x 10 ³	4.97	94 x 10 ³	4.97
30	96 x 10 ³	4.98	97 x 10 ³	4.99
31	73 x 10 ³	4.86	72 x 10 ³	4.86
32	1 x 10 ²	2.00	1 x 10 ²	2.00
33	18 x 10 ³	4.26	19 x 10 ³	4.28
34	14 x 10 ³	4.15	15 x 10 ³	4.18
35	1 x 10 ²	2.00	1 x 10 ²	2.00
36	3 x 10 ⁴	4.48	3 x 10 ⁴	4.48
37	1 x 10 ²	2.00	1 x 10 ²	2.00
38	51 x 10 ⁴	5.71	53 x 10 ⁴	5.72
39	29 x 10 ⁴	5.46	28 x 10 ⁴	5.45
40	66 x 10 ⁴	5.82	65 x 10 ⁴	5.81

GRAFICO N° 1: Comparación recuento de Aerobios Método Convencional vs Método Petrifilm®



En el gráfico N° 1 se presenta la línea de regresión del Recuento de Aerobios y un coeficiente de correlación de 0.99946 entre ambos métodos.

RECuento DE AEROBIOS EN PLACAS PETRIFILM®

FOTO Nº 1

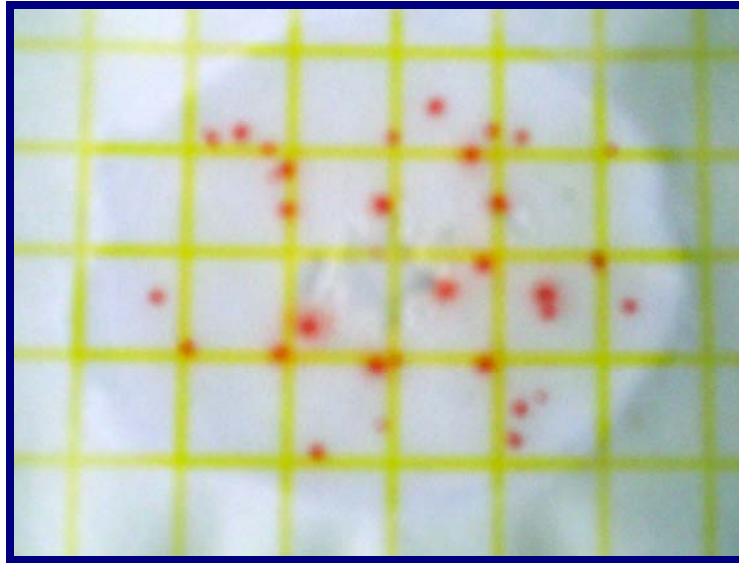


FOTO Nº 2

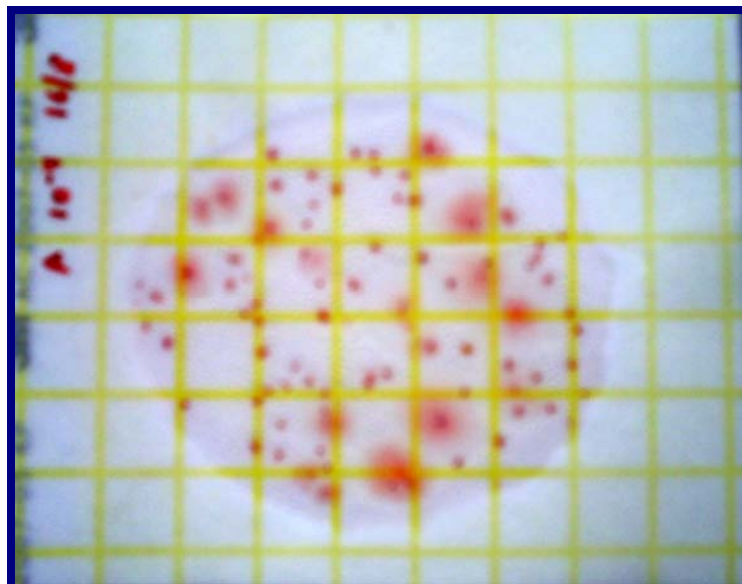
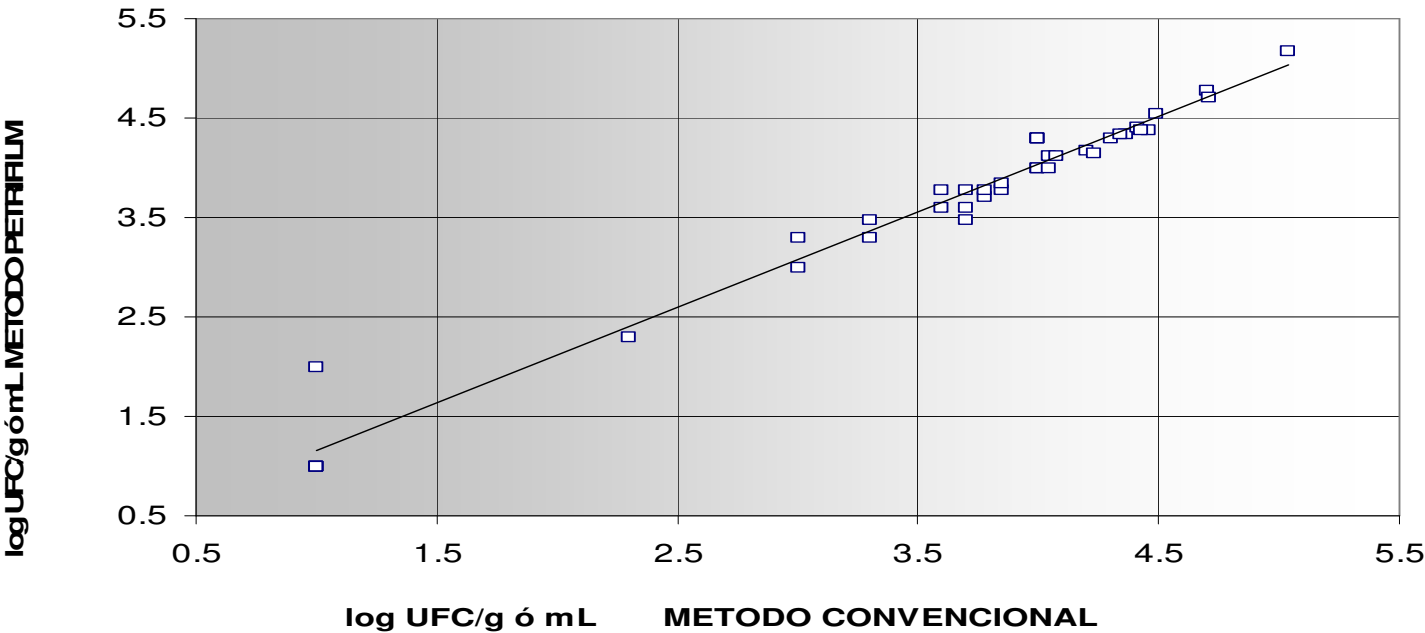


Tabla Nº 2: Resultado del recuento de Levaduras y Mohos de los productos

derivados de la maca:

MUESTRA	METODO CONVENCIONAL UFC/g ó mL	log UFC/g ó mL	METODO PETRIFILM UFC/g ó mL	log UFC/g ó mL
	PROMEDIO		PROMEDIO	
1	1×10^4	4.00	2×10^4	4.30
2	16×10^3	4.20	15×10^3	4.18
3	29×10^3	4.46	24×10^3	4.38
4	1×10^4	4.00	1×10^4	4.00
5	< 10	1.00	< 10	1.00
6	31×10^3	4.49	35×10^3	4.54
7	23×10^3	4.36	22×10^3	4.34
8	< 10	1.00	< 10	1.00
9	< 10	1.00	< 10	1.00
10	20×10^3	4.30	20×10^3	4.30
11	< 10	1.00	< 10	1.00
12	2×10^2	2.30	2×10^2	2.30
13	5×10^4	4.70	6×10^4	4.78
14	51×10^3	4.71	50×10^3	4.70
15	< 10	1.00	< 10	1.00
16	< 10	1.00	1×10^2	2.00
17	11×10^4	5.04	15×10^4	5.18
18	4×10^3	3.60	4×10^3	3.60
19	1×10^4	4.00	1×10^4	4.00
20	2×10^3	3.30	3×10^3	3.48
21	7×10^3	3.85	6×10^3	3.78
22	6×10^3	3.78	5×10^3	3.70
23	1×10^4	4.00	2×10^4	4.30
24	26×10^3	4.41	25×10^3	4.40
25	17×10^3	4.23	14×10^3	4.15
26	11×10^3	4.04	10×10^3	4.00
27	1×10^3	3.00	2×10^3	3.30
28	6×10^3	3.78	6×10^3	3.78
29	2×10^3	3.30	2×10^3	3.30
30	1×10^3	3.00	1×10^3	3.00
31	5×10^3	3.70	4×10^3	3.60
32	4×10^3	3.60	6×10^3	3.78
33	11×10^3	4.04	13×10^3	4.11
34	1×10^4	4.00	2×10^4	4.30
35	22×10^3	4.34	22×10^3	4.34
36	27×10^3	4.43	24×10^3	4.38
37	12×10^3	4.08	13×10^3	4.11
38	5×10^3	3.70	3×10^3	3.48
39	5×10^3	3.70	6×10^3	3.78
40	7×10^3	3.85	7×10^3	3.85

GRAFICO N° 2: Comparación recuento de Levaduras y Mohos Método Convencional vs Método Petrifilm®



En el gráfico N° 2 se presenta la línea de regresión del Recuento de Levaduras y Mohos, el coeficiente de correlación de 0.98681 entre ambos métodos.

RECuento DE LEVADURAS Y MOHOS EN PLACAS PETRIFILM®

FOTO Nº 3

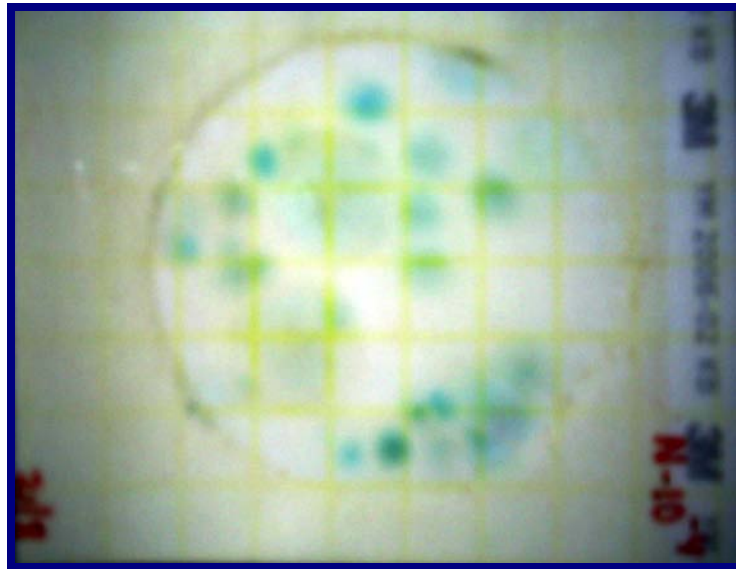


FOTO Nº 4



GRAFICO Nº 3: Resultado del Recuento de Aerobios empleando el Método Convencional y Placas Petrifilm®:

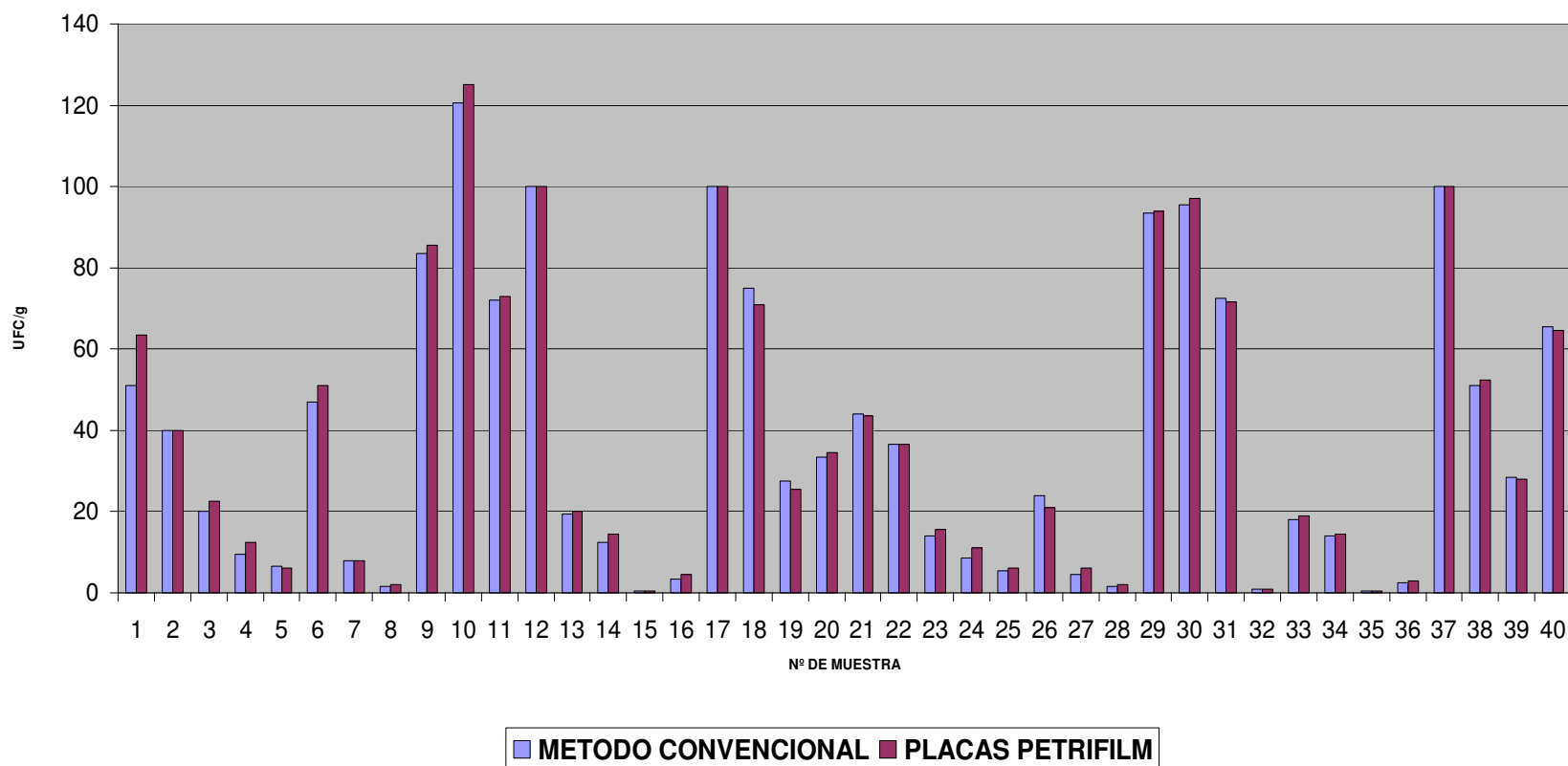


GRAFICO Nº 4: Resultado del Recuento de hongos y levaduras empleando el Método Convencional y Placas Petrifilm®:

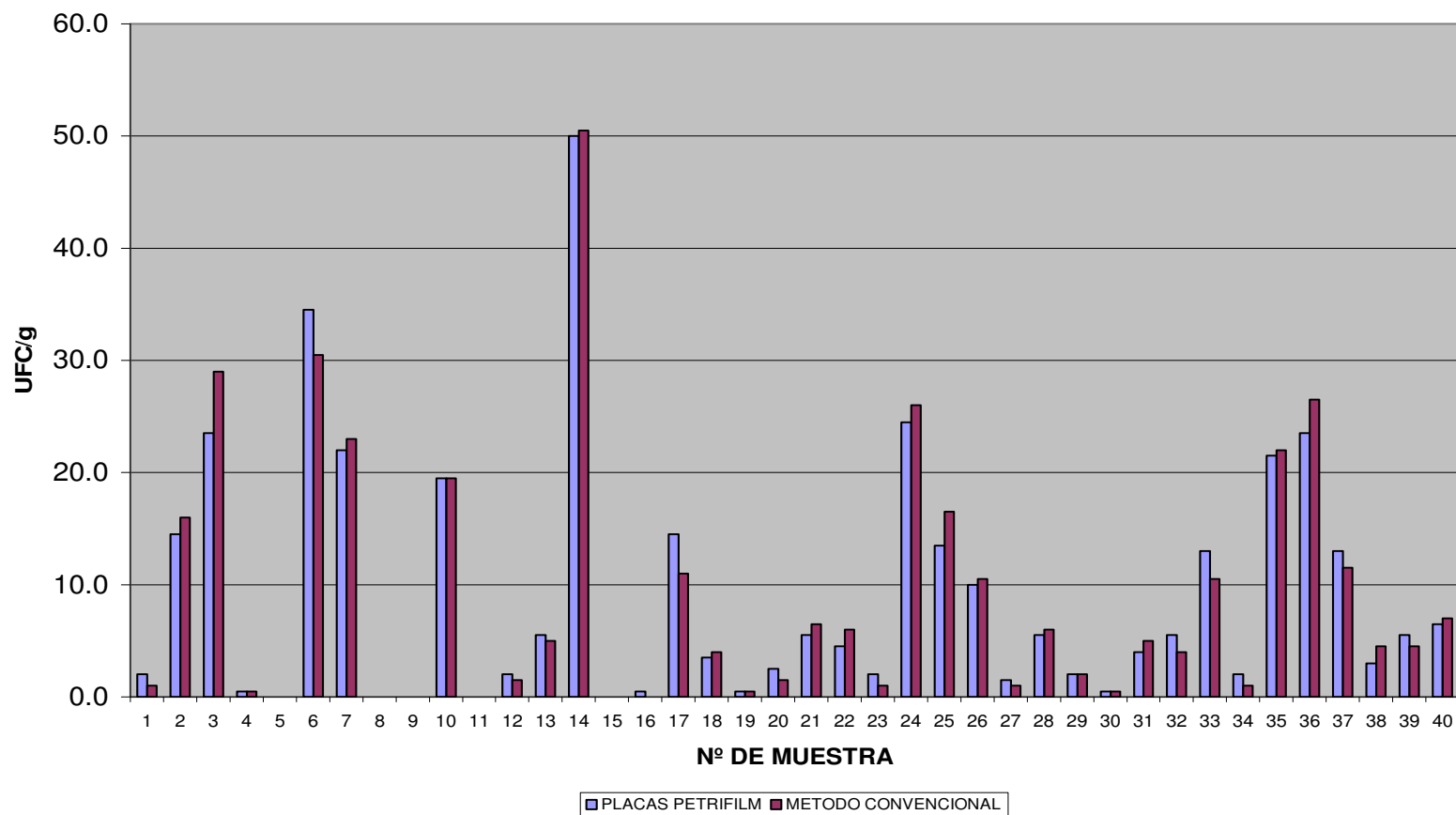


GRAFICO N° 5: Resultado del Recuento de aerobios empleando el Método Convencional y Placas Petrifilm®:

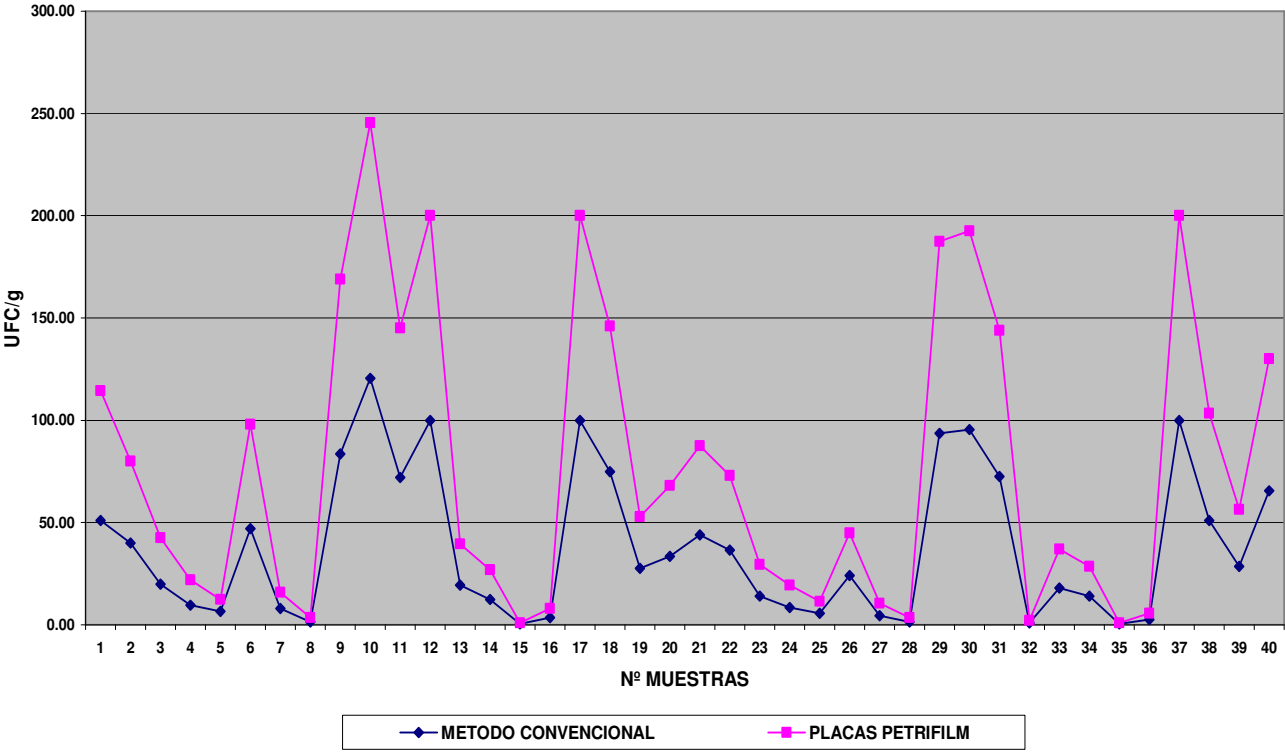


GRAFICO Nº 6: Resultado del Recuento de hongos y levaduras empleando el Método Convencional y Placas Petrifilm®:

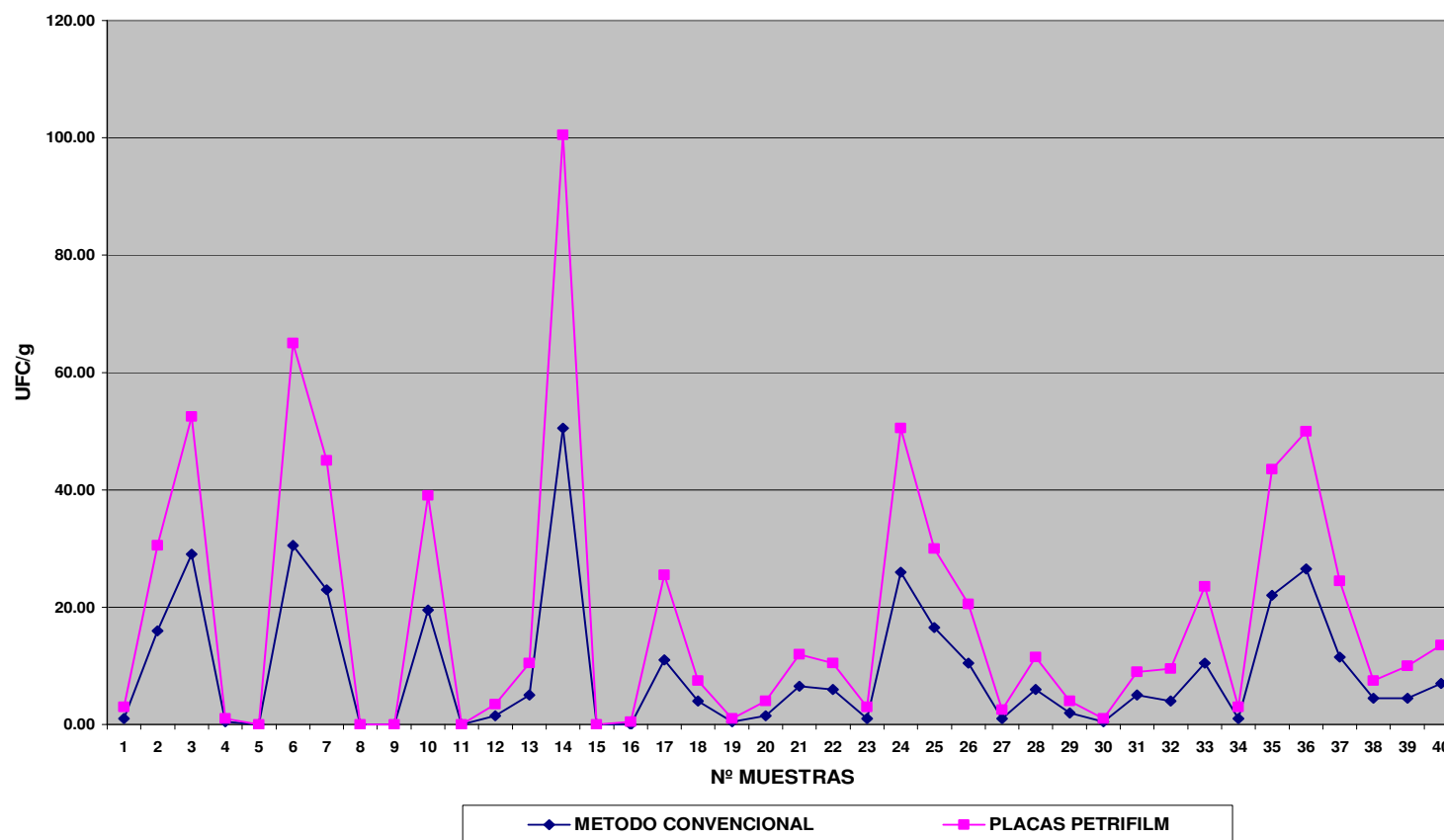


Tabla N° 3: Resultado del porcentaje del recuento de aerobios de los productos derivados de la maca con respecto a las especificaciones de la OMS:

TIPO DE MUESTRA	HARINA				TABLETAS				CAPSULAS				JARABES				TOTAL			
METODO EMPLEADO	Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm		Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm		Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm		Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm		Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm	
	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%
MUESTRAS QUE CUMPLEN ESPECIFICACIONES DE LA OMS	4	25	4	25	2	50	2	50	2	16.67	2	16.67	2	25	2	25	10	25	10	25
MUESTRAS QUE NO CUMPLEN ESPECIFICACIONES DE LA OMS	12	75	12	75	2	50	2	50	10	83.33	10	83.33	6	75	6	75	30	75	30	75

Tabla N° 4: Resultado del porcentaje del recuento de Levaduras y Mohos de los productos derivados de la maca con respecto a las especificaciones de la OMS:

TIPO DE MUESTRA	HARINA				TABLETAS				CAPSULAS				JARABES				TOTAL			
METODO EMPLEADO	Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm		Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm		Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm		Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm		Método convencional (Placa Petri)		Método de recuento en placa Petrifilm	
	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%	Nª muestras	%
MUESTRAS QUE CUMPLEN ESPECIFICACIONES DE LA OMS	2	12.5	2	12.5	2	50	2	50	2	16.67	2	16.67	0	0	0	0	6	15	6	15
MUESTRAS QUE NO CUMPLEN ESPECIFICACIONES DE LA OMS	14	87.5	14	87.5	2	50	2	50	10	83.33	10	83.33	8	100	8	100	34	85	34	85

V. DISCUSIÓN

En el ámbito nacional, luego de la búsqueda bibliográfica surgió que el método Petrifilm® ha sido evaluado por Burga G., Gianina ⁽²⁾ quienes mencionan que los recuentos obtenidos con el sistema de placas Petrifilm® y con el método convencional para la determinación del Límite Microbiano en Champúes no presentan diferencia significativa.

Estudios encontrados en otros países demuestran que las placas Petrifilm® para el recuento en agua y alimentos son efectivas, obteniéndose buenos coeficientes de correlación respecto al método convencional. Vail, R. Morgan y colaboradores ⁽³⁷⁾ monitorearon *E. coli* en agua potable usando placas de recuento Petrifilm® para coliformes/*E. coli* previamente validado para enumerar *E. coli* en alimentos. Este estudio hace una comparación de recuento de *E. coli* en agua potable obtenido con placas Petrifilm® con tres pruebas disponibles comercialmente y usados comúnmente. Los resultados con Petrifilm® tuvieron una alta correlación.

La determinación del recuento microbiológico de las plantas medicinales es necesaria para el uso de las mismas como materia prima de diversos productos, en el presente trabajo se logró determinar que el total de las muestras de productos derivados de la maca presentan recuento microbiano. Ya Guerrero, J. ⁽⁴⁾ menciona la presencia de niveles elevados de microorganismos en plantas medicinales deshidratadas expandidas en el comercio ambulatorio de Lima.

Es importante resaltar que el método de placas Petrifilm® es reconocido por la Association of Oficial Analytical Chemists (AOAC) para el recuento de aerobios en alimentos ⁽³⁵⁾ y para el recuento de hongos y levaduras ⁽³⁴⁾.

De la búsqueda bibliográfica realizada no se ha encontrado trabajos de investigación en el ámbito nacional sobre el uso de placas Petrifilm® para el recuento microbiano en plantas medicinales o en sus derivados. De ahí la necesidad del presente trabajo de comparar el método convencional y el método de recuento en placas Petrifilm®, habría que considerar que el uso de placas Petrifilm® para el recuento de aerobios nos ofrece mayor sensibilidad, sin embargo en los resultados obtenidos para el recuento de Hongos y Levaduras se evidencia una menor sensibilidad que el recuento convencional, esta diferencia de sensibilidad puede deberse a que el medio de cultivo en placas Petri conservan mejor la humedad que las placa Petrifilm® ya que estas son rehidratadas con una cantidad de exacta de diluyente, concordando con el estudio realizado por Burga y Reyes ⁽²⁾. Y es conocida la importancia de la presencia de humedad para un mejor cultivo de hongos y levaduras que puedan estar presentes en cualquiera de las muestras a ser evaluadas.

Con respecto al cumplimiento de requisitos planteados por la OMS ⁽¹⁾ se obtuvo que el 85% (34 muestras) no cumple con lo especificado para el Recuento de Aerobios, Levaduras y Mohos. Y el 15% (6 muestras) cumple con lo especificado por la OMS.

Por otro lado los resultados obtenidos por cada uno de los métodos empleados no presentaron diferencia significativa, este resultado coincide por lo reportado por AMER L. et al ⁽³⁶⁾ quienes comparan la metodología de cuantificación de mesófilos aerobios totales por el método estándar propuesto por la FDA y el método de recuento en Placas Petrifilm® en drogas vegetales, encontrando una diferencia significativa con un $p > 0,001\%$, entre ambos métodos, con un 95% de probabilidad.

Teniendo en cuenta los resultados de los análisis de regresión obtenidos puede considerarse una muy buena alternativa el uso de Placas Petrifilm® para el recuento microbiano. La sencillez de su uso de las placas Petrifilm®, la eliminación de la preparación de medios de cultivo, disminución de costos, tiempo, personal son las ventajas que servirían de justificación para su uso en el control microbiológico en los procesos de industrialización de drogas vegetales. También mencionan Vail, R. Morgan y colaboradores ⁽³⁷⁾ que las Placas Petrifilm® se hacen apropiadas para monitoriar E. coli y entre sus características se incluye su fácil uso, exactitud razonable, sensibilidad dentro de un rango apropiado, seguridad, bajos costos, fácil almacenamiento. Del mismo modo AMER L. et al ⁽³⁶⁾ concluyen que las placas Petrifilm® constituyen una buena alternativa para su uso en el recuento de mesófilos aerobios totales, además menciona que la sencillez de la técnica, la mejor visualización de las colonias, entre otros justificarían su utilización para el control microbiológico.

VI. CONCLUSIONES

- Las muestras analizadas por el método de placas Petrifilm® y por el método convencional presentan recuento microbiano.
- Los resultados estadísticos muestran que no existe diferencia significativa entre el método de placas Petrifilm® y el método convencional, al realizar el análisis de regresión se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.99946 y 0.98681 para el recuento de aerobios y para el recuento de levaduras y mohos respectivamente.
- Los resultados obtenidos en el recuento microbiano demuestran que el método alternativo de placas Petrifilm® puede reemplazar al método convencional.

VII. RECOMENDACIONES

- Promover el uso de Placas Petrifilm® para el análisis Microbiológico en los procesos de Control de Calidad de las industrias que elaboran productos de naturales de origen vegetal, debido a su fácil uso, son más económicas, no se requiere la preparación de medios de cultivo a diferencia del método convencional.
- Que los productos naturales no presenten recuento microbiano cerca al límite superior exigido, para garantizar y evitar posibles cambios en su formulación como consecuencia de la acción de los microorganismos.
- Promover la evaluación de la calidad de los productos de origen vegetal a través del organismo regulador de Salud mediante pesquisas. Asegurando así que todo producto que llegue al consumidor se encuentre apto para su uso.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud Centro Nacional de Control de Calidad. - Registro y Control de Calidad de Recursos y Productos Naturales de Uso en Salud. Serie de documentos N°9. (1999)
2. Burga G, Reyes E. Placas Petrifilm® como método alternativo en la determinación del límite Microbiano en Champúes de Expendio ambulatorio. (1999). Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UNMSM.
3. Blackburn CW, Baylis CL and Petito SB . Evaluation of Petrifilm® methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in a wide range of foods. Lett Appl Microbiol. 1996; 22(2); 137-40.
4. Guerrero J. Evaluación Microbiológica de Plantas Medicinales Deshidratadas Expendidas en el Comercio Ambulatorio del Cercado de Lima (1988). Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. UNMSM.
5. Jordano R, Lopez C, Rodríguez V, Cordoba G, Medina LM and Barrios J, Comparison of Petrifilm® method to convencional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, *Escherichia coli* and yeast and molds in foods. Acta Microbiol Immunol Hung, 1995; 42(3): 255-9.
6. Knight MT, Newman MC, Benzinger MJ, Neufang KL, Agin JR, Allister JS, and Ramos M. Comparison of the Petrifilm® dry rehydratable film and

convencional culture methods for enumeration of yeast and molds in foods: collaborative study. J AOAC Int, 1997; 80(4). 806-23.

7. Ministerio de Salud.- Control de Calidad de Medicamentos Herbales y similares Seminario taller. (1996).
8. Park YH, Seo KS, Ahn JS, Yoo HS, and Kim SP. Evaluation of the petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retailed meta samples. J Food Prot, 2001; 64(11): 1841-3.
9. SANT'ANA, A. et al. Comparação entre métodos rápidos Simplate R TPC-CL e Petrifilm R AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aerobios mesófilos em sorvetes. Braz. J. Food Technol. (2003) v.6, n.1, p.85-89.
10. Petrifilm Clases y Usos. Editado por Bio Sen 3M. Santé. Tarragona 106. Barcelona. 1996.
11. Instrucciones de Uso y Guía de Interpretación para el Recuento de Aerobios. Petrifilm 3M. Barcelona. 1998.
12. Instrucciones de Uso y Guía de Interpretación para el recuento de Hongos y Levaduras. Petrifilm 3M. Barcelona. 1998.

13. Instrucciones de Uso y Guía de Interpretación para el recuento de Enterobacteriaceae. Petrifilm 3M. Barcelona. 1998.
14. Instrucciones de Uso y Guía de Interpretación para el recuento de Coliformes. Petrifilm 3M. Barcelona. 1998.
15. Instrucciones de Uso y Guía de Interpretación para el recuento de *E. coli*. Petrifilm 3M. Barcelona. 1998.
16. Manual de Medios de Cultivo. Merck. México D.F. 1985.
17. Taniwaki M, da Silva N, Bahne A, Lamanaka B. Comparison of Culture Media, simplate, and Petrifilm for Enumeration of Yeast and Molds in Food Journal of Food Protection (2001) Vol 64 nº 10, pp. 1592-1596 (5).
18. Tórtora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. Editorial Acribia, Zaragoza – España. 1993.
19. Universidad Politécnica de Valencia. Introducción al Control de Calidad en la Industria Alimentaria. Servicio de Publicaciones. 1997.
20. Espinoza J, Pumacayo Z. Plantas Medicinales más comunes empleadas en el Perú. 2001.

21. Recetario de Hierbas y plantas Medicinales. Ediciones Euromexico S.A. de C.V. 2000.
22. Obregón L. Instituto de Fitoterapia Americana. Maca, Planta Medicinal y Nutritiva del Perú. 1998.
23. Ruiz R. Obtención y caracterización de una bebida en polvo a base de Maca (*Lepidium Meyenii Walpers*) Kiwicha (*Amaranthus caudatus L.*) y Cacao (*Theobroma cacao L.*). Tesis. Lima Perú 2002.
24. Publicación CONCYTEC. Plantas Medicinales del valle del Mantaro. Lima 2001.
25. Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos y Afines. D.S. N° 010-097-SA. Título cuarto de los Recursos Terapéuticos Naturales. Modificación: D.S. N° 004-2000-SA.
26. Programa de Promoción de la Innovación de FIA. Como producir y procesar plantas medicinales y aromáticas de calidad. Boletín Trimestral ISSN 0718-0357 N° 8. Chile. 2003.
27. Acosta L. Desinfección de Plantas Medicinales-Principios básicos. Cuba. 2002.

28. Alfaro T, Chalala M, Rodríguez L, Rodríguez C, Ramos R, Carballo C, Cabezas C. Lavado y Desinfección de Drogas Vegetales. Normas Técnicas. 2001.
29. Sincholle D, Cotta M, Guedon D, Coll R. Plantas Medicinales y decontaminación. Pharm. Acta Helv. 1987, 62 (1): 14-18.
30. Briceño L. Guía de análisis de alimentos. Facultad de Industrias Alimentarias. UNALM. 1999.
31. Downes F.P. & ITO K. eds. Compendium of Methods for the Microbiological examination of Foods. 4th Ed. American Public Health Association. Washington, DC. USA. 2001.
32. American Public Health Association. 1992. Standar Methods For the Examination of Dairy Products, 16th ed. APHA, Washington, DC. pp. 221-222, 231-232.
33. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. Official Method 989.10. Bacterial and Coliform counts in Dairy Products. Official Methods of analysis of AOAC Internacional. 17 Ed. AOAC Internacional, Gaithersburg, MD.

34. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. Official Method 997.02. Yeast and Mold Counts in Foods. Official Methods of Analysis of AOAC Internacional. 17 Ed. AOAC Internacional, Gaithersburg, MD.
35. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. Official Method 990.12. Aerobic Plate Count in Foods. Official Methods of Analysis of AOAC Internacional. 17 Ed. AOAC Internacional, Gaithersburg, MD.
36. AMER L, De Battista G, Medvedeff M y Bagardi S. Evaluation of Petrifilm method for Total aerobic mesophyllic microorganisms count determination in vegetable drugs.2000. 41:4; pp. 383 – 386.
37. Vail M, Merino C, Gonzales F, Millar R and Ram J. Enumeration of Waterborne *Escherichia coli* with Petrifilm Plate: Comparison to Standard Methods. J. Environ (2003). Volumen 32 p.368-373.
38. Beloti V, de Souza J, De Aguiar M, Nero LA, Rodrigues M, Vieira V, Bilia L. Evaluation of Petrifilm TM EC and HS for total coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water Braz. J. Microbiol. (2003) vol.34 n° 4.
39. Easter M. Rapid Microbiological methods in the Pharmaceutical Industry. USA. 2003,
40. Farmacopea Europea. 5ta Edición. 2005.

IX. ANEXOS

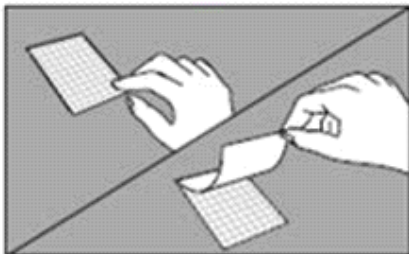
Anexo 1: Recuento de Aerobios en Placas Petri Convencionales y Placas Petrifilm®:

Nº	METODO CONVENCIONAL			PLACAS PETRIFILM®			DESVIACION ESTANDAR
	1º	2º	PROMEDIO	1º	2º	PROMEDIO	
1	50 x 10 ⁴	52 x 10 ⁴	51 x 10 ⁴	60 x 10 ⁴	67 x 10 ⁴	64 x 10 ⁴	8.84
2	42 x 10 ³	38 x 10 ³	40 x 10 ³	41 x 10 ³	39 x 10 ³	40 x 10 ³	0.00
3	19 x 10 ³	21 x 10 ³	20 x 10 ³	24 x 10 ³	21 x 10 ³	23 x 10 ³	1.77
4	8 x 10 ⁴	11 x 10 ⁴	10 x 10 ⁴	14 x 10 ⁴	11 x 10 ⁴	13 x 10 ⁴	2.12
5	7 x 10 ³	6 x 10 ³	7 x 10 ³	6 x 10 ³	6 x 10 ³	6 x 10 ³	0.35
6	49 x 10 ⁴	45 x 10 ⁴	47 x 10 ⁴	50 x 10 ⁴	52 x 10 ⁴	51 x 10 ⁴	2.83
7	8 x 10 ⁴	8 x 10 ⁴	8 x 10 ⁴	8 x 10 ⁴	8 x 10 ⁴	8 x 10 ⁴	0.00
8	1 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³	0.35
9	84 x 10 ³	83 x 10 ³	84 x 10 ³	86 x 10 ³	85 x 10 ³	86 x 10 ³	1.41
10	125 x 10 ³	117 x 10 ³	121 x 10 ³	129 x 10 ³	121 x 10 ³	125 x 10 ³	3.18
11	69 x 10 ³	75 x 10 ³	72 x 10 ³	76 x 10 ³	70 x 10 ³	73 x 10 ³	0.71
12	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	0.00
13	19 x 10 ³	20 x 10 ³	20 x 10 ³	20 x 10 ³	20 x 10 ³	20 x 10 ³	0.35
14	12 x 10 ³	13 x 10 ³	13 x 10 ³	15 x 10 ³	14 x 10 ³	15 x 10 ³	1.41
15	1 x 10 ²	<10	1 x 10 ²	1 x 10 ²	< 10	1 x 10 ²	0.00
16	4 x 10 ⁴	3 x 10 ⁴	4 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	4 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	0.71
17	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	0.00
18	70 x 10 ⁴	80 x 10 ⁴	75 x 10 ⁴	70 x 10 ⁴	72 x 10 ⁴	71 x 10 ⁴	2.83
19	25 x 10 ⁴	30 x 10 ⁴	28 x 10 ⁴	24 x 10 ⁴	27 x 10 ⁴	26 x 10 ⁴	1.41
20	31 x 10 ⁴	36 x 10 ⁴	34 x 10 ⁴	34 x 10 ⁴	35 x 10 ⁴	35 x 10 ⁴	0.71
21	46 x 10 ⁴	42 x 10 ⁴	44 x 10 ⁴	40 x 10 ⁴	47 x 10 ⁴	44 x 10 ⁴	0.35
22	35 x 10 ³	38 x 10 ³	37 x 10 ³	34 x 10 ³	39 x 10 ³	37 x 10 ³	0.00
23	13 x 10 ³	15 x 10 ³	14 x 10 ³	16 x 10 ³	15 x 10 ³	16 x 10 ³	1.06
24	7 x 10 ⁴	10 x 10 ⁴	9 x 10 ⁴	12 x 10 ⁴	10 x 10 ⁴	11 x 10 ⁴	1.77
25	5 x 10 ³	6 x 10 ³	6 x 10 ³	6 x 10 ³	6 x 10 ³	6 x 10 ³	0.35
26	23 x 10 ⁴	25 x 10 ⁴	24 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	20 x 10 ⁴	21 x 10 ⁴	2.12
27	4 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	6 x 10 ⁴	6 x 10 ⁴	6 x 10 ⁴	1.06
28	1 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³	2 x 10 ³	0.35
29	91 x 10 ³	96 x 10 ³	94 x 10 ³	94 x 10 ³	94 x 10 ³	94 x 10 ³	0.35
30	98 x 10 ³	93 x 10 ³	96 x 10 ³	97 x 10 ³	97 x 10 ³	97 x 10 ³	1.06
31	70 x 10 ³	75 x 10 ³	73 x 10 ³	73 x 10 ³	70 x 10 ³	72 x 10 ³	0.71
32	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	0.00
33	16 x 10 ³	20 x 10 ³	18 x 10 ³	18 x 10 ³	20 x 10 ³	19 x 10 ³	0.71
34	15 x 10 ³	13 x 10 ³	14 x 10 ³	15 x 10 ³	14 x 10 ³	15 x 10 ³	0.35
35	1 x 10 ²	< 10	1 x 10 ²	1 x 10 ²	< 10	1 x 10 ²	0.00
36	2 x 10 ⁴	3 x 10 ⁴	3 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	4 x 10 ⁴	3 x 10 ⁴	0.35
37	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	1 x 10 ²	0.00
38	50 x 10 ⁴	52 x 10 ⁴	51 x 10 ⁴	50 x 10 ⁴	55 x 10 ⁴	53 x 10 ⁴	1.06
39	27 x 10 ⁴	30 x 10 ⁴	29 x 10 ⁴	29 x 10 ⁴	27 x 10 ⁴	28 x 10 ⁴	0.35
40	65 x 10 ⁴	66 x 10 ⁴	66 x 10 ⁴	64 x 10 ⁴	65 x 10 ⁴	65 x 10 ⁴	0.71

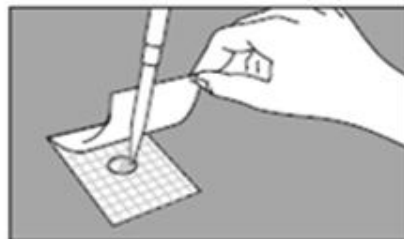
**Anexo 2: Recuento de Levaduras y Mohos en placas Petri Convencionales
y Placas Petrifilm®:**

Nº	METODO CONVENCIONAL			PLACAS PETRIFILM			DESVIACION ESTANDAR
	1º	2º	PROMEDIO	1º	2º	PROMEDIO	
1	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	3×10^4	2×10^4	0.71
2	14×10^3	18×10^3	16×10^3	16×10^3	13×10^3	15×10^3	1.06
3	27×10^3	31×10^3	29×10^3	24×10^3	23×10^3	24×10^3	3.89
4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	0.00
5	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	0.00
6	28×10^3	33×10^3	31×10^3	36×10^3	33×10^3	35×10^3	2.83
7	26×10^3	20×10^3	23×10^3	24×10^3	20×10^3	22×10^3	0.71
8	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	0.00
9	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	0.00
10	22×10^3	17×10^3	20×10^3	19×10^3	20×10^3	20×10^3	0.00
11	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	0.00
12	2×10^2	1×10^2	2×10^2	3×10^2	1×10^2	2×10^2	0.35
13	5×10^4	5×10^4	5×10^4	6×10^4	5×10^4	6×10^4	0.35
14	51×10^3	50×10^3	51×10^3	51×10^3	49×10^3	50×10^3	0.35
15	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	0.00
16	< 10	< 10	< 10	1×10^2	< 10	1×10^2	0.35
17	12×10^4	10×10^4	11×10^4	16×10^4	13×10^4	15×10^4	2.47
18	5×10^3	3×10^3	4×10^3	4×10^3	3×10^3	4×10^3	0.35
19	1×10^4	< 10	1×10^4	1×10^4	< 10	1×10^4	0.00
20	2×10^3	1×10^3	2×10^3	2×10^3	3×10^3	3×10^3	0.71
21	8×10^3	5×10^3	7×10^3	6×10^3	5×10^3	6×10^3	0.71
22	7×10^3	5×10^3	6×10^3	4×10^3	5×10^3	5×10^3	1.06
23	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	3×10^4	2×10^4	0.71
24	24×10^3	28×10^3	26×10^3	26×10^3	23×10^3	25×10^3	1.06
25	18×10^3	15×10^3	17×10^3	14×10^3	13×10^3	14×10^3	2.12
26	11×10^3	10×10^3	11×10^3	10×10^3	10×10^3	10×10^3	0.35
27	2×10^3	< 10	1×10^3	2×10^3	1×10^3	2×10^3	0.35
28	8×10^3	4×10^3	6×10^3	5×10^3	6×10^3	6×10^3	0.35
29	2×10^3	2×10^3	2×10^3	2×10^3	2×10^3	2×10^3	0.00
30	1×10^3	< 10	1×10^3	1×10^3	< 10	1×10^3	0.00
31	6×10^3	4×10^3	5×10^3	4×10^3	4×10^3	4×10^3	0.71
32	5×10^3	3×10^3	4×10^3	6×10^3	5×10^3	6×10^3	1.06
33	12×10^3	9×10^3	11×10^3	14×10^3	12×10^3	13×10^3	1.77
34	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4	3×10^4	2×10^4	0.71
35	20×10^3	24×10^3	22×10^3	20×10^3	23×10^3	22×10^3	0.35
36	28×10^3	25×10^3	27×10^3	24×10^3	23×10^3	24×10^3	2.12
37	12×10^3	11×10^3	12×10^3	12×10^3	14×10^3	13×10^3	1.06
38	4×10^3	5×10^3	5×10^3	3×10^3	3×10^3	3×10^3	1.06
39	5×10^3	4×10^3	5×10^3	5×10^3	6×10^3	6×10^3	0.71
40	8×10^3	6×10^3	7×10^3	7×10^3	6×10^3	7×10^3	0.35

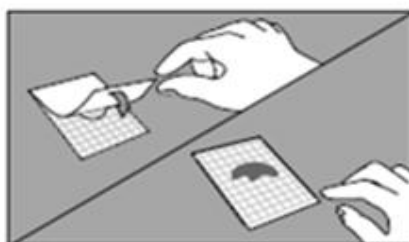
Anexo 3: Método de Inoculación de las Placas Petrifilm®:



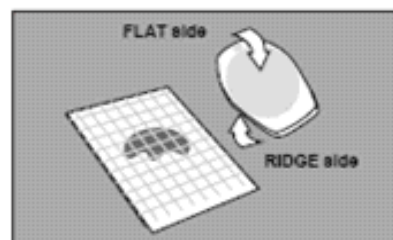
Paso 1: Levantar el film superior que cubre la placa



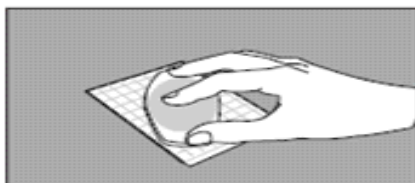
Paso 2: Dejar caer la muestra en el centro de la placa.



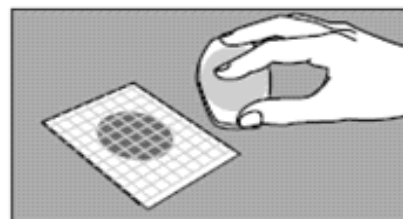
Paso 3: Dejar caer suavemente el film, cuidando de que no queden burbujas.



Paso 4: Sujetar el difusor de la placa.



Paso 5: Hacer una ligera presión con el difusor.



Paso 6: Levantar el difusor.